

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

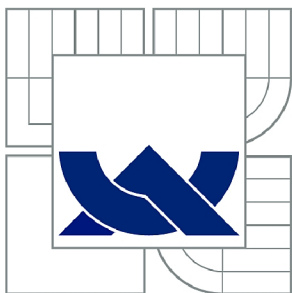
VLIV ZPŮSOBU PĚSTOVÁNÍ VINNÉ RÉVY NA POPULACI KVASINEK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

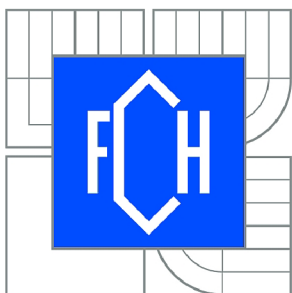
Bc. IVANA JIŘÍKOVÁ

BRNO 2011



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

VLIV ZPŮSOBU PĚSTOVÁNÍ VINNÉ RÉVY NA POPULACI KVASINEK

INFLUENCE OF GRAPE GROWING METHODS ON YEASTS COMMUNITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. IVANA JIŘÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2011



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0484/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Ivana Jiříková	
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:

Vliv způsobu pěstování vinné révy na populaci kvasinek

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše na zadané téma
2. Sledování možných změn v populaci kvasinkové mikroflóry v závislosti na způsobu pěstování vinné révy, izolace kvasinek
3. Využití metod molekulární biologie k identifikaci izolovaných kvasinek
4. Zpracování výsledků a jejich zhodnocení

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

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

Bc. Ivana Jiříková
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V této diplomové práci byl sledován vliv ekologického způsobu pěstování vinné révy na populaci vinných kvasinek. Vinné kvasinky byly izolovány z odrůdy Rulandské modré a pro jejich identifikaci byla využita molekulárně biologická metoda PCR-RFLP.

V literární rešerši jsou zpracovány základní informace o kvasinkách, poznatky o výrobě červeného vína a také informace o molekulárně biologických metodách.

V experimentální části byl pro analýzu použit specifický úsek 5,8S-ITS rDNA, který byl s využitím primerů ITS1 a ITS4 naamplifikován a následně podroben restriční analýze. Při restriční analýze byly využity tyto restriční endonukleázy – *HaeIII*, *HinfI*, *Taq^αI*, *AluI* a *MseI*. Pomocí programu BioNumerics byla posouzena genetická podobnost mezi jednotlivými izolovanými kvasinkami a bylo provedeno taxonomické zařazení.

ABSTRACT

This diploma thesis has analyzed the effect of organic wine-growing on the wine yeasts population. The wine yeasts were isolated from the Pinot Noir variety. They were identified by the molecular biological method PCR-RFLP.

The theoretical research compiles basic information on yeasts, knowledge about the red wine production as well as information on molecular biological methods.

The experimental part utilizes the 5,8S-ITS rDNA specific segment for analysis. The segment was amplified using the ITS1 and ITS4 primers and subjected to restriction analysis. The restriction analysis has used these restriction endonucleases - *HaeIII*, *HinfI*, *Taq^αI*, *AluI* and *MseI*. The BioNumerics software was then used to compare genetic similarity between the isolated yeasts and these were taxonomically classified.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, identifikace, PCR-RFLP, výroba vína

KEYWORDS

Yeasts, identification, PCR-RFLP, wine making

JIŘÍKOVÁ, I. *Vliv způsobu pěstování vinné révy na populaci kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 78 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

Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Vránové, Ph.D. za všestrannou pomoc, cenné rady a odborné vedení při realizaci této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Haně Šuranské za motivaci a psychickou podporu při vypracovávání této diplomové práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	Kvasinky	9
2.1.1	Taxonomie kvasinek	9
2.1.2	Systematické zařazení kvasinek	9
2.1.3	Morfologie kvasinek	9
2.1.4	Cytologie	10
2.1.5	Růst a rozmnožování	11
2.1.5.1	Vegetativní rozmnožování	11
2.1.5.2	Pohlavní rozmnožování	12
2.1.6	Metabolismus kvasinek	12
2.1.6.1	Ethanolové kvašení	13
2.1.7	Nejvýznamnější potravinářské kvasinky	14
2.1.7.1	Rod <i>Saccharomyces</i>	14
2.1.7.2	Rod <i>Hanseniaspora</i>	15
2.1.7.3	Rod <i>Rhodotorula</i>	15
2.1.7.4	Rod <i>Pichia</i>	15
2.1.7.5	Rod <i>Candida</i>	16
2.1.7.6	Rod <i>Kluyveromyces</i>	16
2.1.7.7	Rod <i>Schizosaccharomyces</i>	17
2.1.7.8	Rod <i>Zygosaccharomyces</i>	17
2.1.7.9	Rod <i>Issatchenkia</i>	18
2.1.7.10	Rod <i>Metschnikowia</i>	18
2.1.7.11	Rod <i>Saccharomycodes</i>	18
2.2	Vinařství	19
2.2.1	Odrůda Rulandské modré	20
2.2.2	Hrozny vinné révy	21
2.2.2.1	Třapina	21
2.2.2.2	Bobule	21
2.2.3	Technologie výroby červených vín	22
2.2.3.1	Sklizeň a přejímka hroznů	22
2.2.3.2	Odzrňování a mletí	22
2.2.3.3	Ošetřování rmutu	23
2.2.3.4	Nakvášení	24
2.2.3.5	Lisování	25
2.2.3.6	Kvašení moštu	25
2.2.3.7	Dokvášení vína a odbourávání kyselin	26
2.2.3.8	Ošetřování a školení vína	26
2.2.4	Ekologická produkce vína	28
2.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	29
2.3.1	Princip a průběh reakce	30
2.3.2	Komponenty potřebné pro PCR směs	31
2.3.2.1	Primery	31
2.3.2.2	DNA polymerázy	32
2.3.2.3	Směs nukleotidů (dNTPs)	33

2.3.2.4	Pufř s Mg ²⁺ ionty	33
2.3.2.5	Templátová DNA	33
2.3.3	Termocyklér	34
2.3.4	Přehled PCR metod	34
2.4	PCR – RFLP	34
2.4.1	Restrikční endonukleázy	35
2.5	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	36
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1	Chemikálie, přístroje a pomůcky, suroviny a použité mikroorganismy	38
3.1.1	Chemikálie	38
3.1.2	Přístroje a pomůcky	38
3.1.3	Suroviny a použité mikroorganismy	39
3.2	Odběry vzorků.....	39
3.3	Příprava kultivačních médií.....	39
3.3.1	Příprava sladinného kultivačního média	39
3.3.2	Příprava šikmých agarů	40
3.4	Příprava chemikálií.....	40
3.4.1	Příprava 10×TBE pufřu	40
3.4.2	Příprava 1×TBE pufřu	40
3.4.3	Příprava 1×TBE pufřu s ethidium bromidem	40
3.4.4	Příprava ethidium bromid (EtBr)	40
3.4.5	Příprava 3 M octanového pufřu	40
3.4.6	Příprava 2% agarózového gelu	41
3.4.7	Příprava délkových standardů	41
3.4.7.1	100 bp	41
3.4.7.2	20 bp	41
3.4.8	Příprava 80% ethanolu	41
3.4.9	Příprava PCR směsi	41
3.5	Pracovní postupy	42
3.5.1	Izolace kvasinek z vinného moštu	42
3.5.2	Kochova zředřovací metoda	42
3.5.3	Izolace DNA	42
3.5.4	Průběh PCR reakce	43
3.5.5	Elektroforetická detekce produktu PCR reakce	43
3.5.6	Přečiřtění PCR produktu	43
3.5.7	Restrikční analýza	44
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
4.1	Izolace kvasinkové DNA	45
4.2	Amplifikace DNA pomocí metody PCR.....	45
4.3	Restrikční analýza kvasinek pomocí metody PCR-RFLP.....	46
4.3.1	Analýza restrikční endonukleázou <i>Hae</i> III	46
4.3.2	Analýza restrikční endonukleázou <i>Hinf</i> I	48
4.3.3	Analýza restrikční endonukleázou <i>Taq</i> ^o I	50
4.3.4	Analýza restrikční endonukleázou <i>Alu</i> I	52
4.3.5	Analýza restrikční endonukleázou <i>Mse</i> I	54
4.4	Taxonomické zařazení identifikovaných kvasinek.....	56

4.5	Dendrogramy identifikovaných kvasinek	58
5	ZÁVĚR.....	60
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	61
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	66
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	67
9	PŘÍLOHY	68

1 ÚVOD

Složení populace kvasinek na hroznech vinné révy hraje důležitou roli v procesu výroby vína. Na hroznech se nachází různé druhy kvasinek, které odlišnou mírou přispívají ke kvalitě a organoleptickým vlastnostem vína. V současné době je zastáván názor, že charakteristické znaky terroiru se nejzřetelněji projeví pouze vlivem kvasinek, které se nacházejí přímo na hroznech, ze kterých je víno vyráběno. Nicméně tyto kvasinky někdy nejsou schopny zajistit dokonalý průběh fermentace, protože se v přirozeném prostředí vyskytují jen v malém počtu. Stále více vinařů se proto vyhýbá riziku a dává přednost přidávání kvasinkových kultur, které jsou k dostání v obchodě a jejichž vlastnosti jsou přesně známy. Nevýhodou přidávání čistých kvasinkových kultur je obava z možné unifikace chuti vín.

Kvasinky jsou nejpoužívanějšími mikroorganismy v průmyslu a vzhledem k jejich výhodným vlastnostem představují dodnes nepostradatelný model experimentálního výzkumu eukaryotické buňky. Kvasinky jsou široce využívány v řadě oblastí vědy, technologie i medicíny, také hrají velmi důležitou roli při výrobě potravin. Používají se ke kynutí těsta a k výrobě alkoholických nápojů.

Kvasinky nemají jen pozitivní vlastnosti, ale jsou také škůdci kvasných procesů a potravinářských výrob. Jsou důvodem onemocnění lidí i zvířat, proto je velmi důležité je odhalit a charakterizovat. Původně se identifikace a zařazování kvasinek provádělo na základě morfologických testů, srovnáváním fyziologických a výživových vlastností atd. Tyto tradiční techniky jsou složité a časově náročné. V dnešní době jsou k identifikaci a klasifikaci kvasinek využívány rychlé a spolehlivé metody. Mezi molekulárně biologické metody, které slouží k identifikaci kvasinek a k jejich zařazení na druhové a kmenové úrovni patří PCR-RFLP.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy, náležící mezi houby (*Fungi*). Mikroorganismy zahrnované mezi kvasinky, lze charakterizovat tím, že jde většinou o jednobuněčné organismy, rozmnožující se převážně pučením a zpracovávající zdroje uhlíku obvykle kvašením, avšak tato charakteristika neplatí striktně. Některé kvasinky mohou za určitých podmínek vytvářet mycelia, pak mohou tedy existovat i ve vícebuněčné formě. Existují také kvasinky, které navzdory názvu nejsou schopny fermentace a zdroje uhlíku a energie zpracovávají výhradně oxidativními způsoby [1, 2].

Kvasinky rostou převážně v koloniích z jednotlivých buněk s průměrem 5 až 10 μm . Množí se nepohlavně (vegetativně) pučením nebo dělením a pohlavně tvorbou spor. Jsou fakultativně anaerobní, rostou v přítomnosti i v nepřítomnosti vzdušného kyslíku. K devitalizaci kvasinek dochází už při 2 - 5 minutovém zahřátí na 56 °C. Kvasinky často mají vysoké nutriční požadavky na obsah vitaminů a aminokyselin [3, 4].

V přírodě jsou kvasinky velmi rozšířené, jejich přirozenými stanovišti jsou nutričně velmi bohatá prostředí, např. substráty obsahující sacharidy, hlavně ovoce, přítomné jsou v některých květech, ve vzduchu, v půdě, v trávicím traktu lidí, zvířat a některého hmyzu [4].

2.1.1 Taxonomie kvasinek

Nadříše: *Eucaryota*

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Třída: *Ascomycetes*

Basidiomycetes

Deuteromycetes [1]

2.1.2 Systematické zařazení kvasinek

Identifikaci kvasinek se zabývalo velké množství autorů, kteří se pokoušeli kvasinky přehledně klasifikovat. *Hansen* je v roce 1904 rozdělil na kvasinky sporogenní a asporogenní. U nás se klasifikaci zabývala *Anna Kratochvílová-Kocková* [5].

Kvasinky můžeme zařadit do 3 následujících skupin:

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

2.1.3 Morfologie kvasinek

Morfologie je jedním z charakteristických rysů pro klasifikaci a taxonomické zařazení kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů. Rody jsou obvykle děleny podle morfologických charakteristik, např. typ pučení, buněčná morfologie, tvorba asků atd. [7].

Buňky kvasinek vykazují velkou rozmanitost s ohledem na velikost buňky, tvar a barvu. Dokonce i jednotlivé buňky z konkrétního kmene jednoho druhu se mohou lišit. Je to dáno fyzikálními a chemickými podmínkami v prostředí [8].

Za základní tvar se považuje rotační elipsoid, přičemž odchylky mohou jít směrem k sférickému tvaru nebo obráceně k podlouhlé až vláknité formě buňky. Rody kvasinek vytváří protáhnuté buňky, jiné válcovité (rod *Schizosaccharomyces*) a vyskytují se i buňky citronovité (*Kloeckera apiculata*) nebo trojúhelníkovité (rod *Trigonopsis*). Některé rody vytvářejí kromě jednotlivých buněk i zaškrcovaná vlákna, složená z řetězců podlouhlých buněk (*pseudomycelium*) nebo vlákna se stejným průřezem po celé délce, které jsou rozdělené přehrádkami (*mycelium*) [3, 9].

Rozmanité tvary buněk jsou zachyceny na Obr. č. 1. Ve většině případů tvar buněk souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování, jež se děje buď pučením, nebo dělením [1, 3].

Velikost buněk kvasinek se pohybuje v rozmezí 3 – 15 μm . Tvar buněk i jejich velikost jsou do určité míry ovlivněny kultivačními podmínkami a stářím buněk [10].



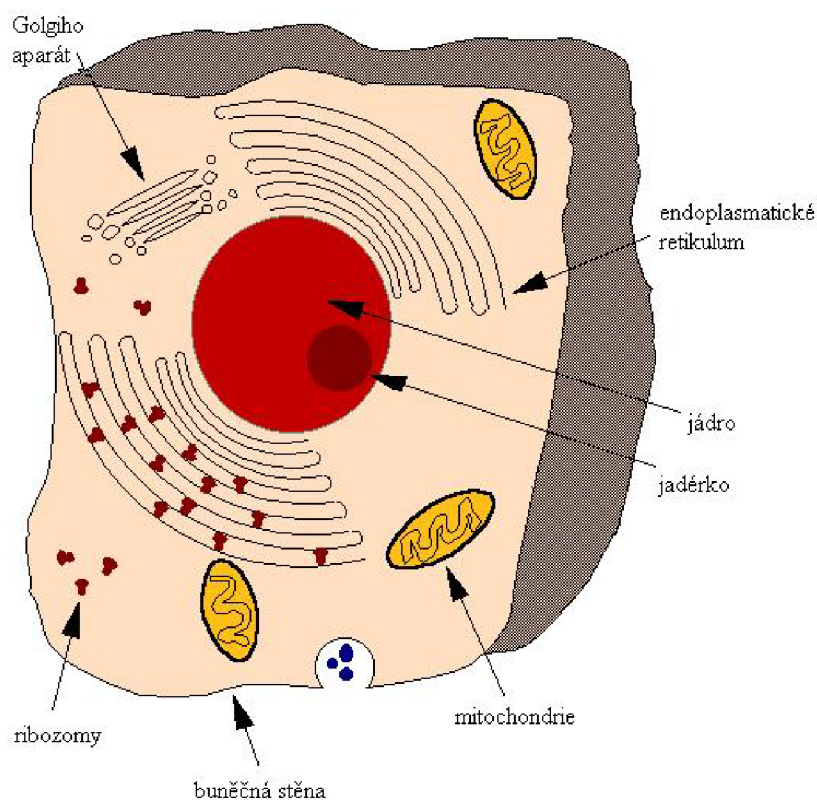
Obr. č. 1: Tvary buněk kvasinek: a – kulatý, b – oválný (elipsoidní), c – citronovitý, d – ogivální, e – lahvovitý, f – podlouhlý, g – vláknitý [12]

2.1.4 Cytologie

Cytologie je věda zabývající se buněčnou strukturou a morfologií strukturních složek buňky. Buňka je okrsek protoplazmy ohraničený na povrchu jemnou cytoplazmatickou membránou a od vnějších vlivů chráněný zpravidla morfologicky silnější buněčnou blánou (buněčnou stěnou). Vlastní protoplazma je rozlišena na jaderný obsah (karyoplazmu) a ostatní živou hmotu (základní cytoplazma). V cytoplazmě nacházíme různé struktury. Jako celek je buňka základní a současně minimální morfologickou a funkční jednotkou živé hmoty, která je schopná samostatné existence [11].

Kvasinky se řadí mezi eukaryotické buňky a jsou tvořeny následujícími strukturami: buněčná stěna, periplasma, plazmatická membrána, cytosol, jádro, mitochondrie, Golgiho aparát, vakuoly a peroxisomy. Organely pohybu kvasinky nikdy nemají a jsou nepohyblivé (viz. Obr. č. 2) [3, 8].

Pevná buněčná stěna chrání buňku před vnějšími vlivy (mechanickými i osmotickými), zabezpečuje její tvar, nízkomolekulární sloučeniny mohou volně přecházet přes póry ve stěně. Hlavní složkou buněčné stěny jsou polysacharidy, které tvoří hustou síť vláken vyplněnou bílkoviny. Přítomné je i malé množství lipidů, fosfolipidů a fosforečnanů, které jsou esterovými vazbami vázány na polysacharidy. Cytoplazmatická membrána je sídlem transportních systémů, ale na rozdíl od bakterií neobsahuje systém oxidační fosforylace. Je volně propustná pouze pro malé molekuly bez náboje, a tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Vnitřní prostor buněk je vyplněn průhlednou hmotou nazývanou cytoplazma, ta obsahuje systém dvojité membrány, souhrnně označovaných jako endoplazmatické retikulum. Na vnějším povrchu obou membrán se nachází zrníčka polyzomů, tj. agregátů ribozomů, v nichž se syntetizují bílkoviny. Dále se v cytoplazmě nachází mitochondrie, kde sídlí dýchací enzymy, vakuoly, Golgiho aparát, cytoskelet a jádro, které je nezbytně nutné pro rozmnožování [1, 3].



Obr. č. 2: Schéma průřezu buňky kvasinky [70]

2.1.5 Růst a rozmnožování

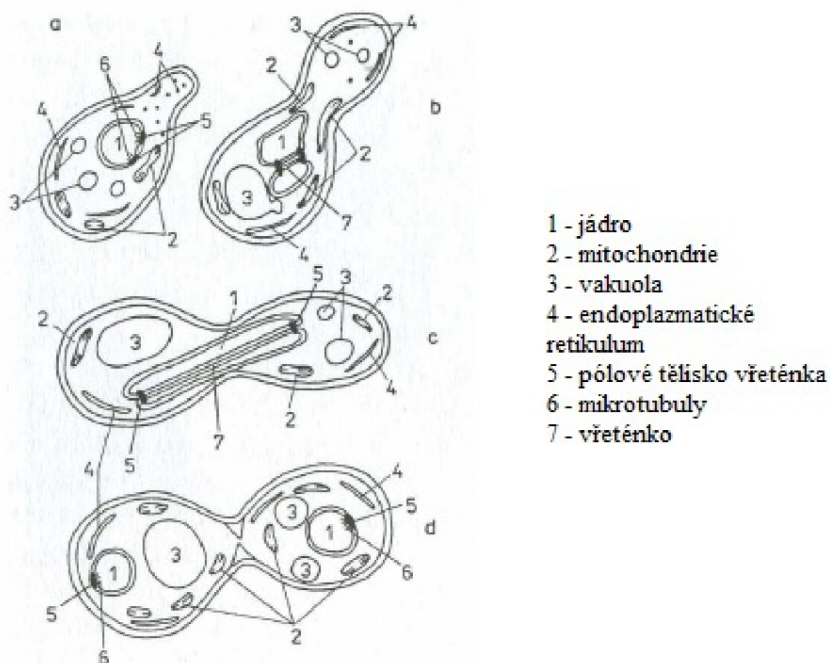
Životní činnost mikroorganismů i jejich vývoj jsou závislé na vnějším prostředí. Aby se mohly mikroorganismy rozmnožovat, musí být v prostředí dostatečné množství látek pro syntézu buněčné hmoty, zdroj využitelné energie a vhodné fyzikální, chemické i biologické podmínky. Jedná se zejména o vhodnou teplotu k růstu a rozmnožování, pH prostředí, vodní aktivitu, oxidoredukční potenciál, povrchové napětí, vliv záření, hydrostatický tlak, toleranci k ethanolu a přítomnost přechodných kovů. Mikroorganismy jsou ovšem schopny se snadno přizpůsobit vnějším podmínkám nejen změnou enzymového vybavení svých buněk, ale mohou do určité míry změnit i jejich složení a tvar, aby byly odolnější [10].

2.1.5.1 Vegetativní rozmnožování

Kvasinky vykazují různé způsoby vegetativního rozmnožování. Mezi nejčastější formy patří pučení, dělení nebo tvorba konidií na krátkých stélkách zvaných sterigmata. Znalost tvorby pupenu je jedním z charakteristických rysů při identifikaci kvasinek [7].

Na povrchu mateřské buňky se v okolí jednoho bodu pozmění struktura buněčné stěny a na tomto místě se objeví pupen. Pupen postupně roste až velikostí dosáhne rozměrů mateřské buňky. Před pučením dochází ke splývání membrán endoplazmatického retikula a pak k jeho dělení, dále k opakovanému dělení vakuol a ke změně tvaru mitochondrií v dlouze protáhlé. Po počátku tvorby pupenu do něho vstupují drobné vakuoly a mitochondrie. Současně se jádro mitoticky rozdělí na dvě a jedno z nich přejde do dceřinné buňky. Uzavřením septa a dotvořením buněčné stěny se obě buňky navzájem oddělí. Na mateřské buňce zůstává v místě oddělení jizva. Podle počtu jizev můžeme určit věk buňky, který odpovídá počtu dceřinných buněk, které se na ni vytvořily. Cyklus dělení, od vzniku pupenu po jeho oddělení od mateřské buňky, za optimálních podmínek trvá přibližně 2 hodiny [1, 3, 9].

Méně častou formou vegetativního rozmnožování kvasinek je příčné dělení. Buňky těchto kvasinek rostou ve směru své délky a při dosažení určité velikosti dochází k mitotickému dělení jader. Každé z jader putuje do protilehlého pólu a ve středu buňky se vytvoří přehrádka (septum) s buněčnou stěnou. Tento způsob rozmnožování připomíná dělení bakterií a je charakteristický jen pro rod *Schizosaccharomyces* [9].



Obr. č. 3: Schéma pučení kvasinek [1]

2.1.5.2 Pohlavní rozmnožování

Vedle vegetativního rozmnožování je u většiny kvasinek známý i pohlavní způsob rozmnožování. Ten je všeobecně charakterizován jako splynutí dvou haploidních buněk a jejich jader za vzniku diploidní buňky – zygoty. Diploidní jádro se dělí meiózou ve čtyři haploidní jádra, která jsou buď základem pohlavních spor, nebo se dělí další mitózou a pak teprve vznikají spory. V životním cyklu kvasinek se tedy pravidelně střídá haploidní a diploidní fáze buněk [1, 9].

Podle způsobu pohlavního rozmnožování patří některé z kvasinek mezi askomycety, jiné mezi basidiomycety (souhrnně označovány jako teleomorfní kvasinky), u některých pohlavní rozmnožování není známo, ty jsou řazeny mezi deuteromycety (anamorfní kvasinky) [12].

2.1.6 Metabolismus kvasinek

Metabolismus odkazuje na biochemické procesy asimilace (anabolické dráhy) a disimilace živin buňkou (katabolické dráhy). Katabolické dráhy jsou spojeny s rozkladem látek, při kterém dochází k uvolňování energie. Tato energie je poté využita v procesu asimilace, kde dochází k biosyntéze látek, různých složek buňky a jejich obalů [8, 12].

Kvasinky využívají cukry jako hlavní zdroj uhlíku. Všechny kmeny mají schopnost metabolizovat glukózu, manózu a fruktózu, mohou také asimilovat galaktózu, maltózu, maltotriózu. Některé kvasinky produkují extracelulární enzymy, které jim umožňují

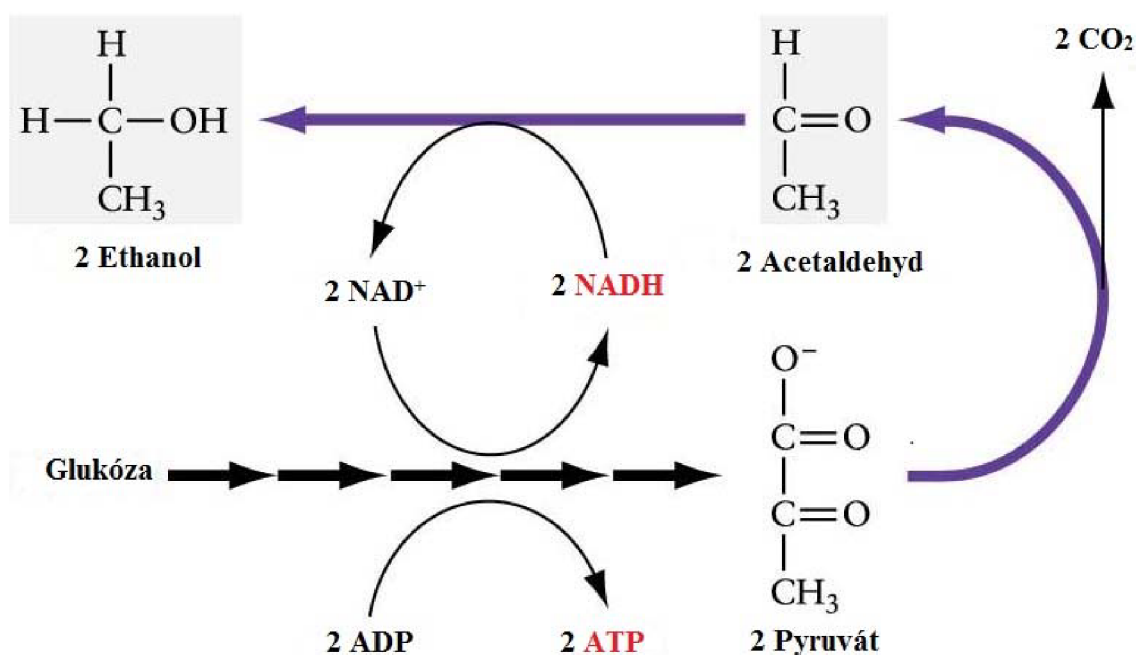
hydrolyzovat také polysacharidy jako škrob, xylany nebo celulózu. Jako zdroj uhlíku mohou ovšem sloužit i další látky – glycerol, ethanol, laktát atd. [2, 13].

Glykolýza, série reakcí, které se vyskytují téměř v každé živé buňce, je považována za jednu z nejstarších metabolických drah. Během glykolýzy je každá molekula glukózy se šesti uhlíky převedena na dvě molekuly pyruvátu, z nichž každá obsahuje tři atomy uhlíku. V anaerobním organismu je pyruvát přeměněn na jeden nebo více produktů, např. ethanol, kys. mléčnou, kys. octovou, CO₂ atd. [14, 15].

2.1.6.1 Ethanolové kvašení

Průmyslově nejvyužívanější metabolickou drahou kvasinek je alkoholové kvašení. Alkoholové kvašení je velmi složitý biochemický děj rozkladu cukru v moště na ethanol a oxid uhličitý, způsobený kvasinkami. V rané fázi kvašení se uplatňují rody *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* a *Kluyveromyces*, v průběhu kvašení jsou nahrazeny rodem *Saccharomyces*, který má větší toleranci k ethanolu [16, 17].

Při ethanolovém kvašení dochází v buňkách kvasinek k dekarboxylaci pyruvátu na acetaldehyd, který je poté redukován pomocí NADH a příslušného enzymu na ethanol. Během procesu dekarboxylace je z molekuly pyruvátu uvolňována molekula CO₂ [15].



Obr. č. 4: Schéma ethanolového kvašení [71]

I když je většina cukrů v procesu fermentace přeměněna na ethanol, vzniká určité malé procento jiných produktů. Mezi něž se řadí glycerol, vyšší jednosytné alkoholy, estery. Vyšší alkoholy a estery pozitivně přispívají k senzorickým vlastnostem vína [1].

Ethanolové kvašení se používá ve velkém měřítku při výrobě alkoholických nápojů a ethanolu pro potravinářské a lékařské účely. Má významnou úlohu při použití pekařského droždí, neboť kynutí v těstě je důsledkem produkce CO₂. Během kvašení se uvolňuje velké množství tepla, proto je velmi důležité sledovat teplotu [1].

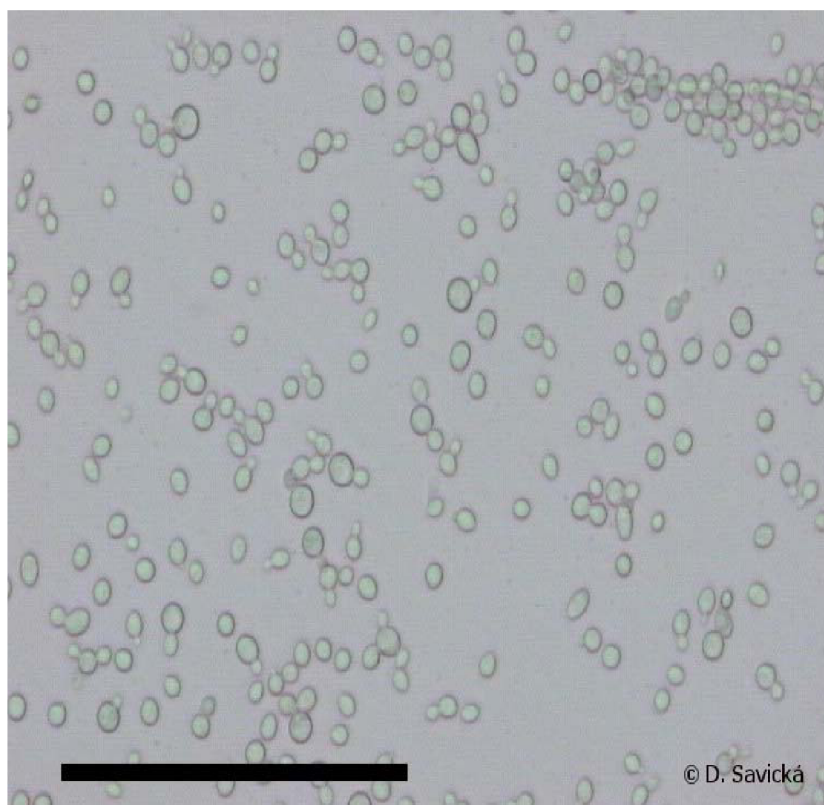
2.1.7 Nejvýznamnější potravinářské kvasinky

2.1.7.1 Rod *Saccharomyces*

Historicky prvními objevenými kvasinkami byli právě zástupci rodu *Saccharomyces*, který ustavil v roce 1838 J. Meyen. Taxonomie rodu *Saccharomyces* prošla významnými změnami v posledních dvou desetiletích. Rod *Saccharomyces* zahrnuje 2 skupiny druhů. Jsou to *Saccharomyces sensu stricto* a *Saccharomyces sensu lato* (druhy vzdáleně související se *Saccharomyces cerevisiae*). Nedávný pokrok v oblasti molekulární biologie vedl k vývoji nových experimentálních metod, díky kterým bylo prokázáno, že komplex *Saccharomyces sensu stricto* se skládá ze sedmi příbuzných druhů: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*, *S. cariocamus*, *S. mikatae* a *S. kudriavzevii*. Původně byla jejich identifikace a charakterizace založena na morfologických a fyziologických vlastnostech [18, 19].

Buňky se vyznačují kulatým, oválným nebo i protáhlejším tvarem. Množí se vegetativně multilaterálním pučením, ale netvoří pravé mycelium. Diploidní buňky se bezprostředně mění na asky. Vzhled kolonií je těstovitý, krémový, světle hnědý, hladký, lesklý, ale může být i skládaný, kráterovitý, drsný, kučeravý [20].

V rámci rodu *Saccharomyces* jsou dva druhy kvasinek spojeny s fermentačním průmyslem, jedná se o *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces bayanus*. Tito významní zástupci fermentují a asimilují glukózu, sacharózu a rafinózu, navíc dokáží asimilovat maltózu a ethanol [21, 22].



Obr. č. 5: *Saccharomyces cerevisiae* – nativní preparát, úsečka znázorňuje vzdálenost 100 μm [20]

2.1.7.2 Rod *Hanseniaspora*

Rod *Hanseniaspora* je rozšířen především na bobulích hroznů. Kolonie jsou hladké, smetanové barvy. Buňky jsou apikulární, citrónovité, oválné až protáhlé. Rod *Hanseniaspora* zahrnuje druhy s různým typem spor. Spory jsou kulaté s hladkou nebo bradavčitou stěnou, některé s ekvatoriálním lemem nebo kloboukovité. Kvasinky rodu *Hanseniaspora* se reprodukují nepohlavně i pohlavně. Nepohlavně se rozmnožují bipolárním pučením, u pohlavního způsobu rozmnožování dochází k tvorbě askospor. Anamorfním protějškem je rod *Kloeckera* s druhem *Kloeckera apiculata* hojně se vyskytujícím v samovolně kvasícím hroznovém moštu. Nejznámější druh je *Hanseniaspora uvarum*, která silně fermentuje glukózu a neasimiluje dusičnany. Vyskytuje se v ovocných šťávách a hroznovém moštu [2, 23, 24].

2.1.7.3 Rod *Rhodotorula*

Jedná se o kvasinky rozšířené ve vzduchu, v půdě, ve sladkých i slaných vodách, ve vinařských provozech, na rostlinách i v různých orgánech živočišného těla. Kolonie jsou hladké, lesklé, slizovité, zbarvené korálovočerveně, pomerančově, lososově. Karotenoidní barviva je chrání před účinkem ultrafialové složky slunečního záření, proto se mohou vyskytovat v ovzduší. Okraj kolonie je ucelený, jen zřídka má primitivní pseudomycelium. V tekutém médiu tvoří *Rhodotorula* sediment a prsteneček. Vegetativně se rozmnožuje pučením a bylo objeveno, že *Rhodotorula* je haploidní stádium v životním cyklu rodu *Rhodospiridium*. Je u nich prokázána schopnost zkvašovat maltózu, sacharózu, laktózu, glukózu, kromě těchto sacharidů asimilují rafinózu, xylózu, arabinózu. Druhy rodu *Rhodotorula* jsou lipidotvorné, za určitých podmínek dochází k nahromadění tuku až v nadměrném množství. S tím souvisí schopnost produkovat lipasy, využívat n-alkany aj.

Patří sem řada druhů: *Rhodotorula glutinis* (synonymum *Rhodotorula gracilis*) vyskytující se v přírodě nejčastěji. Dalšími zástupci jsou *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula graminis* a jiné. Dříve byly považovány za zcela nepatogenní, což v současné době už neplatí. Byla popsána např. oční keratitida způsobená druhem *Rhodotorula rubra* [2, 20, 21, 23].

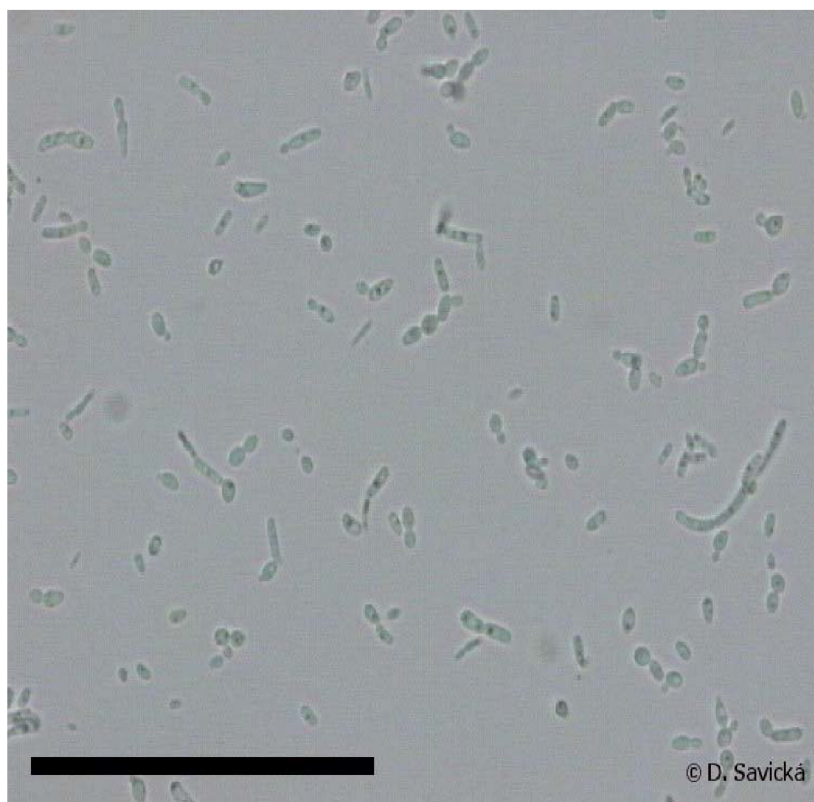
2.1.7.4 Rod *Pichia*

Druhy tohoto rodu se nachází v moštech a víně, jejich zastoupení je nižší než u rodu *Candida*. Kvasinky dokáží využívat velké spektrum sacharidů a asimilovat dusík.

Buňky jsou vejcovitého, cylindrického nebo elipsoidního tvaru. Může dojít k tvorbě pseudomycelia. Vzhled kolonií na tuhých půdách je těstovitý, bílý, hladký a na povrchu moučný. Okraj může být cípovitý nebo kořínkovitý. Vegetativně se rozmnožují multilaterálním pučením, během pohlavního rozmnožování vytváří askus s 1 – 4 spory. Askospory jsou kulovité, někdy kloboukovité, rychle opouštějí askus.

Nejznámější druhy jsou: typový druh *Pichia membranifaciens* a dále biotechnologicky využitelné methylotrófní druhy *Pichia methanolica* a *Pichia pastoris*.

Tyto kvasinky mohou kontaminovat pivo nebo víno a na povrchu tekutiny vytvářejí vzlínavou blanku zvanou křís, také pokožka nebo mázdra [2, 20, 21, 25, 26].



Obr. č. 6: *Pichia membranifaciens* – nativní preparát, úsečka znázorňuje vzdálenost 100 μm [20]

2.1.7.5 Rod *Candida*

Rod *Candida* představuje velmi rozšířenou skupinu a obsahuje druhy jak saprofytické, tak i patogenní, které mohou vyvolat mykotická onemocnění člověka i zvířat.

Rod se vyznačuje rozmanitými tvary buněk, např. cylindrické, protáhnuté, válcovité, elipsoidní atd. Vegetativně se kvasinky rozmnožují multilaterálním pučením. Mohou se tvořit asexuální chlamydospory. Pseudomycelium může být větvené, diferencované s blastokonidiiemi nebo rudimentární. Některé druhy kvasí, ale slaběji než rod *Saccharomyces*.

Z různých druhů tohoto významného rodu jsou na hroznech, v moštu a ve víně nejvíce rozšířené *Candida pulcherrima* v počáteční mikroflóře spontánně kvasících moštů, *Candida vini*, *Candida zeylanoides* a *Candida krusei* ve fázích dokvácení a v mladém víně. Jsou značně rozšířené na stěnách, podlahách a na sudech.

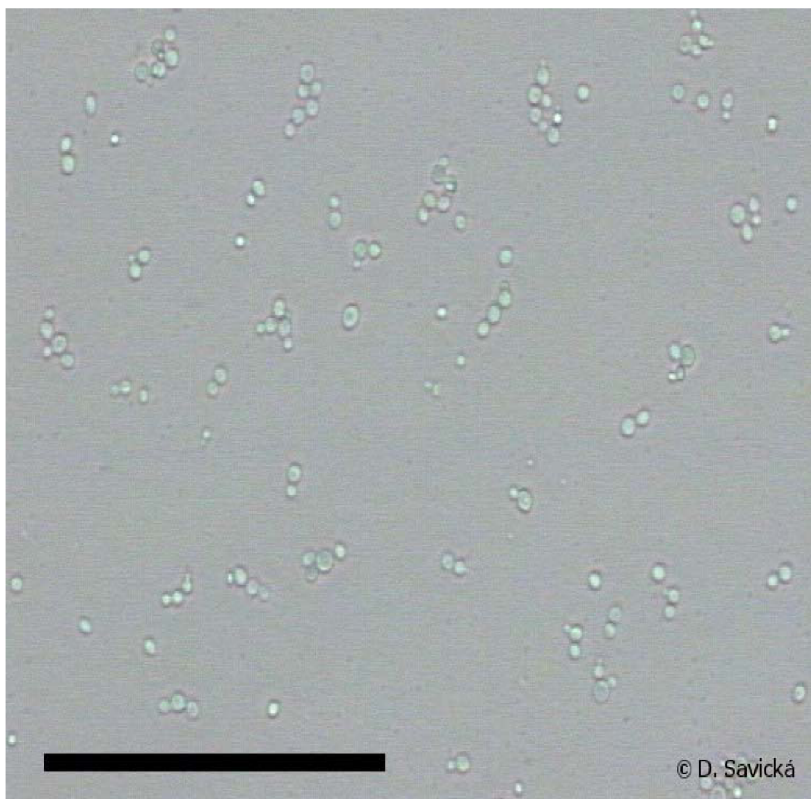
Candida pulcherrima asimiluje a zkvašuje glukózu, neasimiluje ethanol a KNO_3 . Z technologického hlediska je významná hlavně v prvních hodinách kvašení [2, 20, 21, 23, 25].

2.1.7.6 Rod *Kluyveromyces*

Některé druhy rodu *Kluyveromyces* se dříve zařazovaly do rodu *Saccharomyces*, např. *Kluyveromyces marxianus* var. *fragilis* atd. Vyčleněny však byly na základě odlišných vlastností. Vegetativní buňky jsou kulovité, elipsoidní až cylindrické. Spory mají různý tvar. Vzhled kolonií je hnědokrémový nebo krémovošedý, často kombinovaný s růžovým. Povrch může být hladký i bradavičnatý, slizký i matný. U rodu *Kluyveromyces* se tvoří jen rudimentární pseudomycelium. Vegetativně se rozmnožují pučením. Za určitých podmínek se

mohou v kultuře vyvinout i vřečka, v nichž se nacházejí 1 – 4 spory, které se po uvolnění shlukují.

Rod *Kluyveromyces* má schopnost využívat velké množství sacharidů a cukry zkvašuje do koncentrace cca 4 % ethanolu. Biomasa často obsahuje hnědočervené heminové barvivo [20].



Obr. č. 7: *Kluyveromyces lactis* – nativní preparát, úsečka znázorňuje vzdálenost 100 μm [20]

2.1.7.7 Rod *Schizosaccharomyces*

Je to jediný rod kvasinek, který se rozmnožuje dělením jako bakterie. Buňky jsou kulovité, elipsoidní i krátké válečkovité. Kolonie jsou krémové až světle hnědé, měkké, hladké nebo slabě zvrásněné. Okraj je celistvý. Pseudomycelium se nevytváří, jen krátký řetězec buněk. Mohou vytvářet askus s kulovitými nebo elipsoidními askosporami. Buněčná stěna neobsahuje chitin.

Druh nacházející se ve víně či moštu je *Schizosaccharomyces pombe*, který zkvašuje glukózu, sacharózu a maltózu. Tento druh není schopen využívat ethanol jako jediný zdroj uhlíku nebo dusičnany jako zdroj dusíku. *Schizosaccharomyces pombe* nalézá uplatnění ve vinařství k odkyselování vín, protože dovede využívat přítomnou kyselinu jablečnou a vinnou [2, 20, 21, 26].

2.1.7.8 Rod *Zygosaccharomyces*

V řadě vlastností se tyto kvasinky podobají rodu *Saccharomyces*, do něhož původně patřily. Rod *Zygosaccharomyces* je nejvýznamnější zástupce osmotolerantních kvasinek. Buňky se mikroskopicky jeví jako kulovité, elipsoidní nebo protáhlé. Vegetativní rozmnožování je uskutečňováno pomocí multilaterálního pučení. Askospory jsou hladké, kulovité a elipsoidní. Dusičnany nejsou asimilovány. Schopnost fermentovat různé cukry je

závislá na druhu. Mezi několika druhy je třeba uvést zejména osmofilní *Zygosaccharomyces rouxii* a *Zygosaccharomyces bailii*, který kontaminuje víno [2, 26].

2.1.7.9 Rod *Issatchenkia*

Vegetativní způsob rozmnožování tohoto rodu kvasinek je uskutečňován pomocí multilaterálního pučení. Při pohlavním rozmnožování dochází k tvorbě 1 – 4 askospor. Druhy rodu *Issatchenkia* neasimilují dusičnany, mohou však zkvašovat sacharidy. Za nejvýznamnější druh tohoto rodu bývá označován *Issatchenkia orientalis*, který se nachází ve víně. Buňky jsou vejčité až protáhlé. Kvasinka má schopnost využívat glukózu, ethanol, glycerol, sukcinát atd. [26].

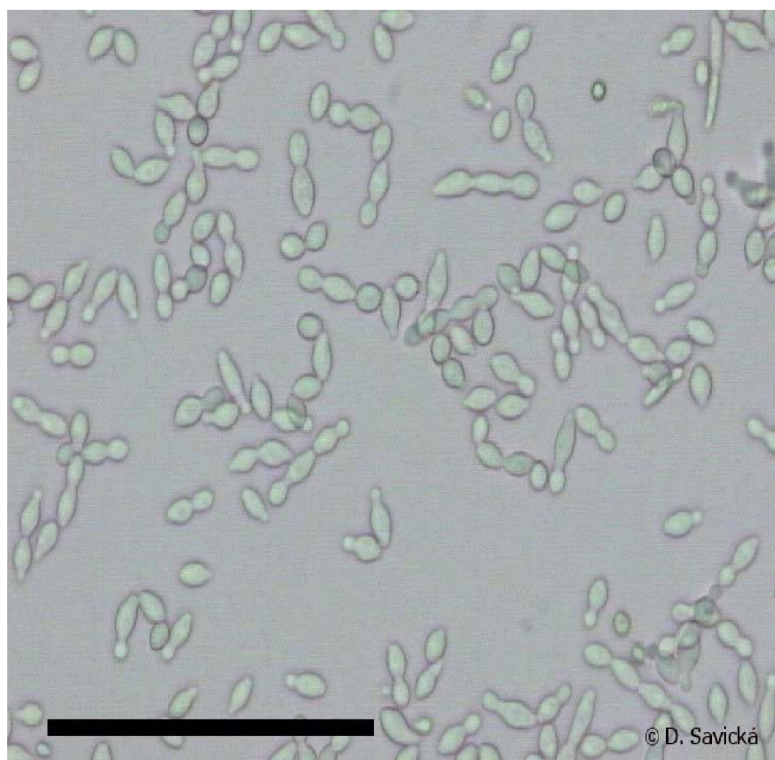
2.1.7.10 Rod *Metschnikowia*

Vegetativní rozmnožování těchto kvasinek je multilaterálním pučením. Buňky jsou kulovité až elipsoidní, hruškovité, cylindrické nebo srpkovité. Druh *Metschnikowia pulcherrima*, významný ve vinařství, tvoří pučící buňky, někdy skromné pseudomycelium. Kvasinky produkují 1 až 2 jehličkovité askospory. Čerstvé izoláty často tvoří intenzivně červené kolonie, barva je způsobena pigmentem pulcheriminem. Na rozdíl od rodu *Rhodotorula* uvolňují pigment do média. Dochází k fermentaci glukózy a fruktózy, ale dochází i k metabolizaci některých cukrů a organických kyselin.

Druhy tohoto rodu se vyskytují ve vodách (*Metschnikowia bicuspidata*) nebo jako druhy pozemní (*M. reukaufii*, *M. pulcherrima* atd.) [2, 23, 27, 28].

2.1.7.11 Rod *Saccharomyces*

Rod kvasinek vyznačující se silnými fermentačními schopnostmi. Dokáží využít glukózu, sacharózu, rafinózu atd. Buňky jsou citrónovité, zakřivené nebo protáhlé. Rozmnožuje se bipolárním pučením na tzv. široké základně. Při pohlavním rozmnožování se vytvářejí asky se 4 kulovitými sporami, které se po vyklíčení ihned spojují. Zástupcem je jediný druh *Saccharomyces ludwigii*, který se vyskytuje v kvasicím hroznovém moštu [20].



Obr. č. 8: *Saccharomyces ludwigii* – nativní preparát, úsečka znázorňuje vzdálenost 100 μm [20]

2.2 Vinařství

Vinařství je potravinářské výrobní odvětví zabývající se zpracováním vinných hroznů, rmutu, hroznového moštu nebo vína, povolenými technologickými postupy, plněním produktu do obalu, označováním produktu a jeho uváděním do oběhu. Technologicky navazuje na vinohradnictví, které se zabývá výsadbou, pěstováním a sklizní révy vinné za účelem produkce vinných hroznů, případně révových roubů atd. Na víno se zpracuje asi 90 % hroznů, 10 % se spotřebuje jako ovoce nebo na výrobu nealkoholických nápojů [16, 29].

Česká republika má dvě hlavní vinařské oblasti – Čechy a Moravu. Vinařské podoblasti ve vinařské oblasti Morava jsou Mikulovská, Slovácká, Velkopavlovická a Znojemská. Vinařské podoblasti ve vinařské oblasti Čechy jsou Mělnická a Litoměřická [30].

Výsledkem technologického procesu je víno, které je jedním z nejdéle známých alkoholických nápojů. Víno je zařazeno mezi pochutiny, ale obsahuje i látky nezbytné pro výživu člověka, jako sacharidy, bílkoviny, mastné kyseliny, vitaminy a minerální látky. Víno je přírodní produkt. Je výsledkem velkého množství biochemických reakcí, které začínají v průběhu dozrávání hroznů, pokračují v průběhu sklizně a končí až ve fázi plnění vína do lahví. Reakce jsou výsledkem spontánní činnosti mikroorganismů a někdy jsou podpořeny cílenou úpravou technologických podmínek [31, 32].

Rozmanitost a složení populace kvasinek významně přispívá k sensorické charakteristice vína. Růst jednotlivých druhů kvasinek se vyznačuje specifickou metabolickou aktivitou, která určuje koncentrace sensoricky aktivních látek ve finálním výrobku. K celkové vyváženosti finálního produktu jsou velmi potřebné apikulátní kvasinky, např. rod *Hanseniaspora*, které produkují estery, glycerol a acetoin [33, 34].

Aromatické látky hroznů jsou uloženy ve slupce bobulí. Jejich tvorba a koncentrace je podmíněna odrudou, teplotou, zralostí a zdravotním stavem hroznů. Nejvíce aromatických

látek obsahují hrozny v období úplné zralosti. Aromatické látky hroznů, moštu a vína tvoří těžké komponenty s koncentrací řádově $10 - 10^{-3}$ ‰. Chemicky jsou směsí aromatických alkoholů, aldehydů, esterů, kyselin, dusíkatých a heterocyklických sloučenin [35].

Nejen samotná vyzrállost suroviny, stanovištní podmínky, ale také odrůda dodává předpoklady k výrobě kvalitního vína. Odrůdy ušlechtilé vinné révy pěstované v našich podmínkách jsou podle praktické upotřebitelnosti zařazeny do tří jakostních tříd:

- I.a třída – výběrové odrůdy, např. Burgundské bílé, Ryzlink rýnský, Sauvignon, Furmint, Tramín, Muškát žlutý, Muškát Ottonel a tokajské odrůdy
- I.b třída – kvalitní odrůdy pěstované ve velkém rozsahu, např. Neuburské, Ryzlink vlašský, Müller-Thurgau, Sylvánské červené a zelené, Svatovavřínecké, Semillon, Frankovka, Cabernet a jejich směsi
- II. třída – Bouviérův hrozen, Ezerjó, Malingerovo rané, Čabajská perla, Veltlínské a omezeně Portugalské modré a jejich směsi
- III. třída – stolní odrůdy např. Bratislavské bílé, Chrupka, Irsay Oliver, Kadarka bílá a červená a jejich směsi [31].

2.2.1 Odrůda Rulandské modré

Synonymum: Pinot Noir

Je to jedna z nejstarších evropských odrůd révy vinné. Tato odrůda je ve Státní odrůdové knize zapsána (ještě jako Burgundské modré) od roku 1941. Patří k odrůdám, které dal do Čech přivést Karel IV. V genotypu odrůdy jsou zakódováni rodiče samovolně v přírodě vzniklé odrůdy z křížení Mlynářka (Pinot meunier) × Tramín. Je to jedna z nejlepších modrých odrůd severních oblastí, pro víno s přívlastkem vyžaduje vhodná teplá stanoviště. Potřebuje dobře prohráté štěrkovité či lehké, hlinito-písčité půdy [36, 37].

Rulandské modré má středně velké, tmavě zelené, mírně třílaločnaté listy, středně husté olistění. Hrozny jsou malé, válcovité, husté. Bobule malé, kulaté, modré, s tenkou slupkou. Dužina je řídká s kořenitou chutí. Odrůda je dobře odolná vůči chorobám, např. plíseň révová (peronospora), padlí révy. Za vlhkého počasí v době dozrávání je citlivá na *Botrytis cinerea*. Z virových chorob je napadána hlavně svinutkou [37, 38].

V České republice se Rulandské modré pěstuje na celkové ploše 717,1 ha. Rulandské modré se také pěstuje v Rakousku, Maďarsku, Jugoslávii, Itálii, Rumunsku, rovněž v zámoří Kalifornie, Chile, Argentina atd. [38, 39].



Obr. č. 9: Odrůda Rulandské modré

2.2.2 Hrozny vinné révy

Hrozny jsou surovina pro výrobu přírodních, dezertních a šumivých vín a vinných destilátů. U stolních odrůd určených k přímé spotřebě v čerstvém stavu se hodnotí především vzhled, velikost bobulí, masitá dužina a tlustší slupka, naproti tomu hrozny moštových odrůd určené k výrobě vína se musí vyznačovat hlavně charakteristickou odrůdovou chutí, extraktivností a vůní [40].

Chemické složení hroznů má rozhodující vliv na kvalitu vyráběného vína a je ovlivněno nejen odrůdou, ale i klimatickými a půdními podmínkami daného ročníku a jejich zralostí. Voda, sacharidy a organické kyseliny jsou nejdůležitější složkou bobulí hroznů a následně získaného moštu. Mošt obsahuje průměrně 780 – 850 g·l⁻¹ vody, která je rozpouštědlem pro většinu ostatních látek. Obsah sacharidů (cukrů) se v moštu pohybuje od 120 – 250 g·l⁻¹, kdy přítomný cukr je tvořen převážně glukózou a fruktózou ve stejném množství. V menším množství se vyskytuje sacharóza a nezkrasitelné pětiuhlíkaté monosacharidy (pentózy) a polysacharid škrob, který se do moštu dostává z rozdrčených třapin. Obsah organických kyselin se v moštu pohybuje od 6 – 15 g·l⁻¹, převládá kyselina vinná a dále jsou přítomny kyselina jablečná, kyselina citronová a v nepatrných množstvích kyselina glukonová, jantarová, šťavelová, fumarová a další. Dalšími chemickými složkami moštu jsou dusíkaté látky, fenolové látky, minerální látky, vitaminy, barviva, aromatické látky, tuky, oleje a další [29, 40].

Na povrchu zdravých hroznů se převážně nachází *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia*, *Hanseniaspora*, *Cryptococcus* a *Rhodotorula*, tyto mikroorganismy se vyskytují v závislosti na stupni zralosti hroznů [41].

Hrozny vinné révy se skládají z třapin se stopkami, které tvoří hlavní nosnou kostru hroznu, a z bobulí různé velikosti, barvy a tvaru. Pro zpracování hroznů jsou nejdůležitější hmotnostní poměry těchto částí hroznů, jejich technologická vyzrálost a chemické složení [31, 40].

2.2.2.1 Třapina

Třapina tvoří 3 – 4 % z hmotnosti hroznů. Před dosažením optimální technologické zralosti je zelená, pak dřevnatá a hnědná [16].

Při výrobě většiny vín jsou třapiny se stopkami balastní součásti, která se musí odstranit, neboť obsahují chuťově nepříznivé trísloviny (polyfenoly) a dřevité látky. Tyto látky by mohly mít negativní vliv na senzorické vlastnosti vína [16, 31].

2.2.2.2 Bobule

Bobule se skládá ze slupky, dužiny a semen, tvoří přes 95 % hmotnosti hroznu. Dužina většiny odrůd je bezbarvá, jen výjimečně je narůžovělá až načervenalá, a obsahuje převážně sladkou šťávu. Skládá se ze dvou vrstev, vnější šťavnatější a vnitřní tužší. Semena jsou uložena uvnitř bobulí ve formě peciček s vysokým obsahem lipidů a tríslovin. Při výrobě červených vín dochází k vyluhování polyfenolů do moštu. Slupka bobulí bývá různě zabarvena a na jejím povrchu je tenká vosková vrstva zabraňující odpařování vody. Barviva a aromatické látky ze slupek ovlivňují odrůdový charakter, chuť i vůni budoucího vína. Slupky mají vysoký obsah polyfenolů, zejména modré odrůdy [29].

2.2.3 Technologie výroby červených vín

Hlavním rozdílem mezi výrobou bílých a červených vín je v nakvašení celých hroznů. Po rozemletí se bobule přesouvají do kádě, kde začne mošt společně se slupkami kvasit (u některých vín i několik týdnů). To má za následek, že se barvivo, které je obsažené pod slupkou, vyluhuje spolu s tříslovinami do vína [42].

2.2.3.1 Sklizeň a přejímka hroznů

Hrozny révy vinné v našich klimatických podmínkách a zeměpisné poloze dozrávají koncem září a začátkem října, kdy probíhá jejich sklizeň (sběr). Hrozny je nejlépe sklízet v tzv. plné technologické zralosti, neboť vína z předčasně sklizených hroznů jsou zpravidla kyselá s drsnou a neharmonickou chutí. Stanovení správného termínu sběru závisí na více faktorech, např. na zdravotním stavu hroznů, jejich vyzrálosti – obsahu cukru, kyselin, barviv, aroma, tříslovin a na požadovaném typu vína. Sklizeň se provádí ručně nebo mechanizovaně pomocí sklízečů. Zásadou by mělo být, že sklizené hrozny se též den zpracují, aby nedošlo k jejich zapaření, což by mohlo vést ke vzniku nežádoucích kyselin [29, 43].

Sklizené hrozny se dopravují do zpracovatelských závodů, kde se zjišťuje hmotnost na vahách. Dále se při přejímce hroznů stanovuje průměrná cukernatost a jakostní skupina podle třídy, odrůdy a obsahu cukru. K určení cukernatosti slouží speciální moštoměry. U nás se cukernatost vyjadřuje ve °ČNM, což udává množství cukru v kg na 100 l moštu, nebo ve °KI, který specifikuje množství cukru v % hmotnostních při 20 °C. V automatizovaných linkách se cukernatost zjišťuje zpravidla refraktometricky [31].

2.2.3.2 Odzrňování a mletí

Při mletí hroznů dochází k rozdrčení bobule a provzdušnění rmutu. Mlecí zařízení musí být sestaveno tak, aby se bobule dostatečně rozemlely, ale aby se přitom nenarušily pecičky a třapiny. Nedostatečně rozdrčené bobule snižují výtěžek rmutu, narušení peciček a třapin snižuje kvalitu budoucího vína. Provzdušnění rmutu je důležité, aby se podpořilo rozmnožování kvasinek v počáteční fázi kvašení. Na druhé straně však podporuje činnost nežádoucích oxidačních enzymů [35].

Odzrňování se provádí na různých typech vystíracích či odstředivkových odzrňovačů, v nichž se v perforovaném válci zachycují třapiny, kdežto rmut jím protéká do sběrné nádrže. K mlýnkování slouží různé typy mlýnků – válcové, bubnové, kladívkové a odstředivé. Stroje, které umožňují mlýnkování a odzrňování najednou, se nazývají agrapumpy nebo fulograpy [31].



Obr. č. 10: Odstraňování třapin [72]

2.2.3.3 Ošetřování rmutu

Mezi způsoby ošetřování rmutu můžeme zařadit následující procesy:

Síření se provádí z více důvodů:

- potlačení velmi aktivních oxidačních enzymů, které mohou od počátku zpracování způsobovat narušení barvy
- potlačení divokých kvasinek a bakterií
- vyvázání vzdušného kyslíku
- podpoření extrakce polyfenolů

Síří se oxidem siřičitým, který vzniká spalováním síry na plátcích ze skelného vlákna nebo stlačeným v tlakových nádobách. Síří se dávkou 25 – 50 mg·l⁻¹, dávky by ale neměly být vyšší, aby se nezabránilo pozdějšímu biologickému odbourávání kyselin. Síření se provádí v různých stádiích výroby. Při zpracování nahnilých a poškozených hroznů musí dojít k síření již ve stadiu rmutu, moštu. Při zpracování zdravých a nepoškozených hroznů se síření oddaluje až do první stáčky. Ve vhodných dávkách působí příznivě na tvorbu buketu i chuťových vlastností budoucího vína a ovlivňuje jakost a stabilitu. Čím dříve se přídatek provede, tím lépe bude rmut chráněn před účinkem vzduchu, potlačí se rozklad barviva, a tím hnědnutí, podpoří se vývoj buketu a jeho čistota. U odrůd s nižší barevnou intenzitou tím může být podpořeno i vyluhování barviva. Pouze v případě skutečně zdravého materiálu a okamžitého zakvašení je možné síření úplně vypustit [31, 37, 44].

Přídavek enzymů – přidáním pektolytických enzymů lze urychlit uvolňování barviva z buněk. Této úpravy se využívá v případech brzkého lisování. Pozornost by měla být věnována i kvalitě enzymů. Špatně vyčištěné přípravky mohou vykazovat řadu vedlejších aktivit, které nežádoucím způsobem odbourají látky obsažené v hroznech [44].

Úprava cukernatosti (zvyšování cukernatosti moštu) se dělá v letech, kdy mošty obsahují málo sacharidů a více kyselin. Upravuje se přídavkem cukru či zahuštěného moštu, nebo postupy, které vedou k zahuštění moštu, např. vakuová destilace, reverzní osmóza, působení chladu (vymrazování vody). Při úpravě cukernatosti je třeba postupovat opatrně, aby se přílišným zásahem nezměnil odrůdový charakter vína. Optimální je poměr 20 – 25 °ČNM

cukru na 6 – 10 % kyselin. V příznivých ročnících je tento poměr zachován a není třeba cukernatost upravovat. Mošty modrých odrůd zásadně doslazujeme před jejich kvašením, protože vyloužení červeného barviva ze slupek je do jisté míry závislé na obsahu alkoholu při kvašení rmutu [29, 43].

2.2.3.4 *Nakvášení*

Má význam u aromatických, muškátových a kořeněných odrůd, dále pak u modrých odrůd pro výrobu červených vín. Pro nakvášení mají být hrozny bezpodmínečně odzrněné a zdravé. Nejčastěji se nakvašuje při teplotě 20 – 25 °C po dobu 4 – 14 dní. Odzrněný rmut kvasí v otevřených nebo uzavřených nádobách, aby se uvolnilo barvivo uložené v plastidech ve slupce bobulí. Vlivem zvyšujícího se obsahu alkoholu v kvasícím rmutu tyto plastidy křehnou a praskají a barvivo se z nich uvolňuje [45].

Červená vína jsou v současnosti vyráběna čtyřmi různými technologickými procesy:

- Výroba červeného vína nakvášením – nejjednodušší způsob je tzv. nakvášení v otevřené kádi s volně plovoucím matolinovým kloboukem. V této nádobě dochází při kvašení k vytváření oxidu uhličitého, který zvedá plovoucí mechanické částice (slupky, zbytky třapin, dužinu) a vytváří z nich poměrně pevný „matolinový klobouk“. Tento klobouk je však třeba rozbít a potápět tak, aby docházelo k maceraci barviv a tříslovin. Ruční potápění je velmi namáhavé, a proto se dnes používají výrobní linky [42].
- Macerace červeného vína zahříváním – ohřevem celého hroznu parou se účinně zničí polyfenoloxidas a naruší se buňky, z nichž se barvivo během krátké doby uvolňuje. Tato technologie je vhodná při nekvalitní surovině, která je napadena plísní. U macerace se dají použít dvě metody: krátkodobý a dlouhodobý ohřev [42].
- Výroba červeného vína kvašením v atmosféře oxidu uhličitého (CO₂) – tato technologie je známa pod názvem uhličitá macerace. Princip metody spočívá v tom, že se celé nerozdrcené hrozny vkládají do vhodných utěsněných nádob, kde leží určitou dobu v atmosféře CO₂. Část hroznů se vždy při manipulaci poruší a to z části na začátku nárazu, z části popraskáním bobulí tlakem hroznů z horních vrstev. Hrozny se nesíří a zpracovávají se i se třapinou. Využívá se principu vnitrobuněčného prokvašení bez přístupu vzduchu. Tento způsob je náročnější na technické vybavení, ale vína jsou jemnější a v poslední době žádaná [29, 37, 43].
- Výroba červených vín „Kvašení přes čtyři“ – výroba spočívá v přidavku staršího vína, jehož alkohol od samého začátku fermentační macerace zintenzivňuje vyluhování červených barviv ze slupek drcených modrých hroznů do kvasícího moštu. Smíchání červeného rmutu s tímto vínem v poměru tak, aby výsledná směs měla 4 obj.% alkoholu [16, 42].



Obr. č. 11: Nakvášení modrých hroznů [72]

2.2.3.5 Lisování

Lisováním hroznů se odděluje kapalina (šťáva, mošt), která byla uvolněna z buněk předchozími technologickými operacemi od tuhých složek – zbytků hmoty bobulí, které se nazývají matoliny. Intenzitu lisování ovlivňuje konstrukce lisu, použitý tlak, mechanické vlastnosti rmutu aj. Rychlost lisování závisí na typu lisu, způsobu lisování, ošetření rmutu před lisováním apod. Při lisování rmutu vytékají postupně jednotlivé podíly moštu. Nejdříve bez tlaku vytéká samotok, pak se provádí lisování (1x až 3x), kde nejdříve vytéká hlavní podíl a na závěr při nejvyšším tlaku tzv. dotažky. Samotok je nejlepší surovinou pro výrobu sektů, ale víno je málo extraktivní pro běžnou výrobu, a proto se dává dohromady s hlavním podílem. Dotažky se zpracovávají zvlášť na méně kvalitní víno nebo na pálení, protože obsahují více látek negativně ovlivňujících kvalitu budoucího vína. Používáme šroubové, pneumatické nebo hydraulické lisy různé konstrukce. U hydraulických lisů se postupně zvyšuje tlak na lisovanou hmotu až do 1,2 – 2,5 MPa. Vyšší tlak může již způsobit drcení semen a tím zhoršení jakosti vína. V současné době jsou považovány za nejlepší lisy pneumatické, které mají uvnitř koše gumový vak, který se kompresorem nafukuje a přitlačuje hrozny nebo rmut k perforovaným stěnám lisovacího koše. Lisuje se za poměrně nízkého tlaku s dobrou výtěžností. Získaný barevný mošt se dále prokvašuje stejným způsobem, jako je tomu při kvašení bílých moštů [16, 29, 37, 43, 45].

2.2.3.6 Kvašení moštu

Kvašení je složitý mikrobiologicko-biochemický proces, na kterém závisí kvalita vyráběného révového vína. Hroznový cukr, který se nachází v moštu, představuje pro mnohé mikroorganismy, hlavně kvasinky a v menší míře pro bakterie nutriční látku. V této fázi se vytváří alkohol a mošt vinné révy se tak pomalu mění na víno [25, 35, 42].

Kvašení začíná buď samovolně (spontánně) činností kvasinek obsažených již v moštu, anebo se mošt zakvašuje čistou kulturou vyšlechtěných kvasinek. Dříve se využívalo především spontánní kvašení způsobené kvasinkami. Dnes se používá čisté neboli řízené kvašení. Zákvas se připravuje v množství 1 % veškerého moštu namnožením vhodných

vinných kvasinek v malém podílu sterilního moštu. Kvašení hroznového moštu je obvykle zahájeno tzv. apikulátními kvasinkami, které jsou málo tolerantní vůči ethanolu, ty převládají v prvních etapách kvašení (např. rod *Hanseniaspora*), a poté jsou nahrazeny kvasinkami rodu *Saccharomyces*, které pokračují v procesu kvašení a ukončí ho [31, 46].

Pro kvašení moštu musíme kvasinkám vytvořit vhodné prostředí. Kvasinky se do moštu dostávají při lisování z bobulí hroznů. Po naplnění moštu do kvasných nádob má velký vliv na kvašení nejen dostatečné množství cukru, ale i teplota. Množení a aktivita kvasinek je nejlepší v rozmezí teploty od 18 do 22 °C. Nejvhodnější teplota sklepa a lisovny v době kvašení by měla být 15 – 16 °C, při níž mošty dobře a rovnoměrně kvasí. Vyšší teplota nad 20 °C je nevhodná, protože dochází k rychlému prokvašení moštu, a tím ke ztrátám buketu i alkoholu [43].

Kvašení hroznového moštu rozdělujeme na tři fáze:

- **Začátek kvašení** – nastává v průběhu nakvašení, které bylo popsáno v kapitole 2.2.3.4. Tato fáze je charakterizována rozmnožováním kvasinek. Zpočátku probíhá zvolna, proto obvykle rmut hned nekvasí, zejména byl-li silněji zasířený. Na začátku rozkvašejí rmut divoké kvasinky, které brzdí činnost kulturních vinných kvasinek. Jakmile rozkvašený rmut obsahuje 3 – 5 objemových % alkoholu, nastává velký obrat ve složení kvasničné mikroflóry. Tato etapa trvá 2 – 3 dny [31, 43].
- **Bouřlivé kvašení** – trvá 2 – 5 dní a prokvasí při něm podstatná část cukru. Alkohol usmrcuje divoké kvasinky a ušlechtilé kvasinky se začnou rychle rozmnožovat. Zvyšuje se teplota moštu až nad 25 °C, nastává větší uvolňování oxidu uhličitého, který strhává i aromatické a těkavé buketní látky, a mošt bouřlivě kvasí. V této fázi kvašení se musí regulovat teplota v rozmezí 15 až 18 °C. Rozkvašený mošt v době, kdy ještě obsahuje více cukru než alkoholu, se nazývá „burčák“ [31, 43].
- **Dokvašení** – nastává po poklesu obsahu cukru na 2 – 5 g·l⁻¹. Fáze může trvat 1 – 2 měsíce, někdy i půl roku. Omezuje se postupně činnost kvasinek až zcela ustane. Po ukončení kvašení a zastavení vývinu oxidu uhličitého začnou kvasinky sedimentovat na dno kvasné nádoby a usazují se i kaly [29].

Kvašení může probíhat v přírodních nádobách ze dřeva, ale dnes se většinou používají nerezové tanky a nádoby z různých umělých hmot určených k potravinářství [42].

2.2.3.7 Dokvašení vína a odbourávání kyselin

Dokvašené víno se odděluje od sedimentu kalů a kvasinek stáčením do čistých zasířených kvasných tanků. Při prvním stáčení se víno obvykle provzdušní a nastane další vysrážení kalů, především tříslobílkovinných. Víno po hlavním kvašení se nazývá mladé víno.

V posledním období se osvědčilo odbourávání kyseliny jablečné z vína pomocí mléčných bakterií, které přeměňují kyselinu jablečnou na méně kyselou kyselinu mléčnou a část odbourávají přeměnou na oxid uhličitý. Tento postup však musí být prováděn přesně, jinak může ve víně zůstat pachut' po kysaném zelí. Dnes se k těmto účelům používají čisté kultury mléčných bakterií, které vytvářejí jen malé množství vedlejších produktů [37].

2.2.3.8 Ošetřování a školení vína

Ošetřování a školení vína dotváří konečné organoleptické vlastnosti a celkový charakter vína. Mladá vína uložená v ležáckých tancích se dolévají vínem, aby nádoby byly stále plné, a tím se zamezilo přístupu vzduchu a kontaminaci. Dolévá se vínem stejné odrůdy a třídy

jakosti. Při stálé a nízké teplotě v ležáckém sklepe dochází k vytváření buketu a k harmonickému vyrovnání sensorických vlastností. Školení vína se provádí před plněním vína do lahví. Skládá se z celého souboru zákroků, které jsou společné pro všechny kategorie réвовého vína, urychlují sedimentaci kalicích částecek, odstraňují nestabilní látky a zlepšují kvalitu vína [31].

Čiření vína – dochází k odstraňování kalicích částecek a látek nestabilních z vína. Pokud čiření neproběhne v dostatečné míře samovolně, dochází k použití srážecích prostředků. Technika je založena na využití elektrických nábojů čiřidel a látek obsažených ve víně. U červených vín se používají k čiření nejčastěji bílkovinná čiřidla (např. želatina), která mají opačný elektrický náboj než třísloviny obsažené v červených vínech [37].

Stabilizace vína – ke stabilizaci vína se používají adsorpční prostředky, na které se koloidní složky vína adsorbují. Víno lze stabilizovat též chladem, neboť silné podchlazení vína pod 0 °C snižuje rozpustnost hydrogenvinanu draselného, který vypadává z vína ve formě krystalků [31].

Pasterace vína – provádí se krátkodobým ohřevem na 60 – 70 °C v deskových průtokových výměnících tepla a následným rychlým ochlazením [29].

Filtrace vína – proces, kde prostřednictvím filtrů odstraňujeme mikroorganismy a kalicí částice. Existuje několik druhů filtrace:

- Síťová filtrace – otvory ve filtrační hmotě jsou menší než kalicí částice
- Absorpční filtrace – filtrační hmota má silný elektrický náboj, který zachytává opačně nabitě kalicí částice
- Kombinovaná filtrace – filtrační hmota kombinuje oba předchozí způsoby
- Cross-flow filtrace – možná jen na speciálním zařízení, které využívá proudění kapaliny k samočištění speciálních filtračních segmentů a nezanáší se.

Velkovýroba vína se bez filtrace neobejde, i když je prokázáno, že ochuzuje vína o mnoho cenných látek. Nefiltrovaná vína lze konzumovat pouze přímo u výrobce a jejich delší skladování v láhvi je problematické [37].

Zrání vína – délka zrání vína je závislá na odrůdě, ročníku a zkušenostech technologa. Nemalý vliv na rychlost a kvalitu zrání mají nádoby, v nichž víno zraje. Mohou se používat skleněné nebo dřevěné nádoby. V moderních vinařstvích jsou to většinou nerezové tanky. V posledních desetiletích se hojně používají dubové sudy, hlavně typu barrique [42].



jizni-svah.blogspot.com / Jan Cerovsky (2007)

Obr. č. 12: Zrání vína v dubových sudech typu barrique [73]

2.2.4 Ekologická produkce vína

Ekologické zemědělství je moderní formou obhospodařování půdy bez používání chemických vstupů s nepříznivými dopady na životní prostředí, zdraví lidí a zdraví hospodářských zvířat. V současné době se do ekologického zemědělství zapojují také vinaři, kteří nechtějí vinnou révu, hrozny, produkty a životní prostředí zatěžovat chemikáliemi, a netouží pít vína, v nichž by mohla být přítomna jejich rezidua. [47].

Pod pojmem biovíno se rozumí víno vyrobené z hroznů vinné révy, které jsou vypěstované podle Nařízení rady EHS/2092/91 o ekologickém zemědělství a Zákona 242/2000 Sb. o ekologickém zemědělství. Nicméně oficiální používání termínu biovíno není v rámci Evropské unie legislativně dovoleno. Hlavním sporným bodem je šíření, u kterého by mělo být sníženo povolené množství síry. V tuto chvíli je pouze možné na etiketu uvést spojení „víno vyrobené z ekologicky pěstovaných hroznů“. Hrozny musí pocházet z vinic, v nichž se nejméně tři roky nepoužívaly žádné umělé pesticidy, fungicidy, herbicidy ani umělá hnojiva. Jejich úlohu nahrazuje kompost, hnůj a přirození nepřátelé hmyzu a škůdců. Struktura půdy se vylepšuje pěstováním krycích plodin a někdy i plevele, které zároveň lákají potřebný hmyz a v některých případech představují i jakousi konkurenci pro příliš čínorodé révové keře [47, 48].

Ve srovnání s integrovanou produkcí, kde je přípustné použití ekotoxikologicky akceptovatelných syntetických pesticidů a díky tomu je v naprosté většině případů možné reagovat na překročení prahu hospodářské škodlivosti chorob či škůdců aplikací některého pesticidu, je ochrana v ekologické produkci postavena především na prevenci. Jde jak o posilování vlastní obranyschopnosti pěstovaných keřů révy, především proti napadení hlavními houbovými chorobami a diverzifikaci ekosystému vinice, tak o stabilizaci celého agroekosystému vinice [49].

Povolená hnojiva:

- hnojiva živočišného původu a vedlejší produkty, jako rybí moučky, krev či kostní moučky
- chlévský hnůj, kompost, kompostované či fermentované kuchyňské odpady či směsi rostlinného původu
- minerální látky přírodního původu, jako např. sádrovce, vápence, jíly, přírodní fosfáty, potaš, draselné soli, draselné sulfáty obsahující hořečnaté soli
- biologické preparáty, organismy a jejich vedlejší produkty
- vedlejší produkty rostlinného původu, jako např. dřevní štěpka, kompostovaná kůra, dřevní popel a sláma
- mořské řasy a preparáty z nich
- stopové prvky (povoleny jsou pouze v přírodních vazbách) [49].

2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR byla vynalezena v roce 1985 vědcem Kary B. Mullisem, který za objev obdržel v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii [50].

Polymerázová řetězová reakce probíhá zcela v podmínkách *in vitro*, tedy bez použití buněk. Pomocí této techniky může být rychle a vysoce selektivně namnožena konkrétní nukleotidová sekvence obsažená v jakékoliv DNA. PCR je velice citlivá metoda, která umožňuje detekci jediné kopie DNA ve vzorku tím, že tuto sekvenci namnoží do té míry, že ji můžeme po separaci gelovou elektroforézou a obarvení snadno detekovat [51].

Vysoká citlivost a specifita PCR způsobuje, že kontaminace i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA postačuje pro získání falešného signálu. Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků byly doporučeny určité standardní postupy zahrnující používání UV – světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše, používání jednorázových rukavic, přidávání DNA do reakce jako poslední složky a pečlivou volbu pozitivních, negativních a vnitřních kontrol [52].

Polymerázová řetězová reakce je v dnešní době široce používána, její využití je shrnuto v tab. č.1.

Tab. č. 1: Využití PCR a jejich modifikací ve výzkumu a praxi [53]

Základní výzkum	Aplikovaný genetický výzkum	Klinické disciplíny	Ostatní
<ul style="list-style-type: none">▪ izolace genů nebo jejich částí▪ sekvencování DNA▪ mutagenese <i>in vitro</i>, modifikace konců DNA▪ analýza klonů z genových knihoven▪ příprava značených sond	<ul style="list-style-type: none">▪ prenatální diagnostika dědičných chorob▪ detekce mutací v genech▪ studium polymorfizmu genů▪ populační genetika	<ul style="list-style-type: none">▪ detekce patogenních bakterií, virů, prvků a hub▪ typizace patogenních mikroorganismů▪ identifikace onkogenů▪ typizace nádorů▪ stanovení pohlaví	<ul style="list-style-type: none">▪ archeologie▪ soudnictví▪ kriminalistika

2.3.1 Princip a průběh reakce

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ prostřednictvím DNA-polymerázy [53].

Nejedná se o sérii manipulací vyžadujících živé buňky, PCR se provádí v jediné mikrozkušavce jednoduše tak, že se DNA smíchá se souborem reagentů a mikrozkušavka se vloží do termálního cykléru (termocyklér). Základní kroky PCR jsou následující:

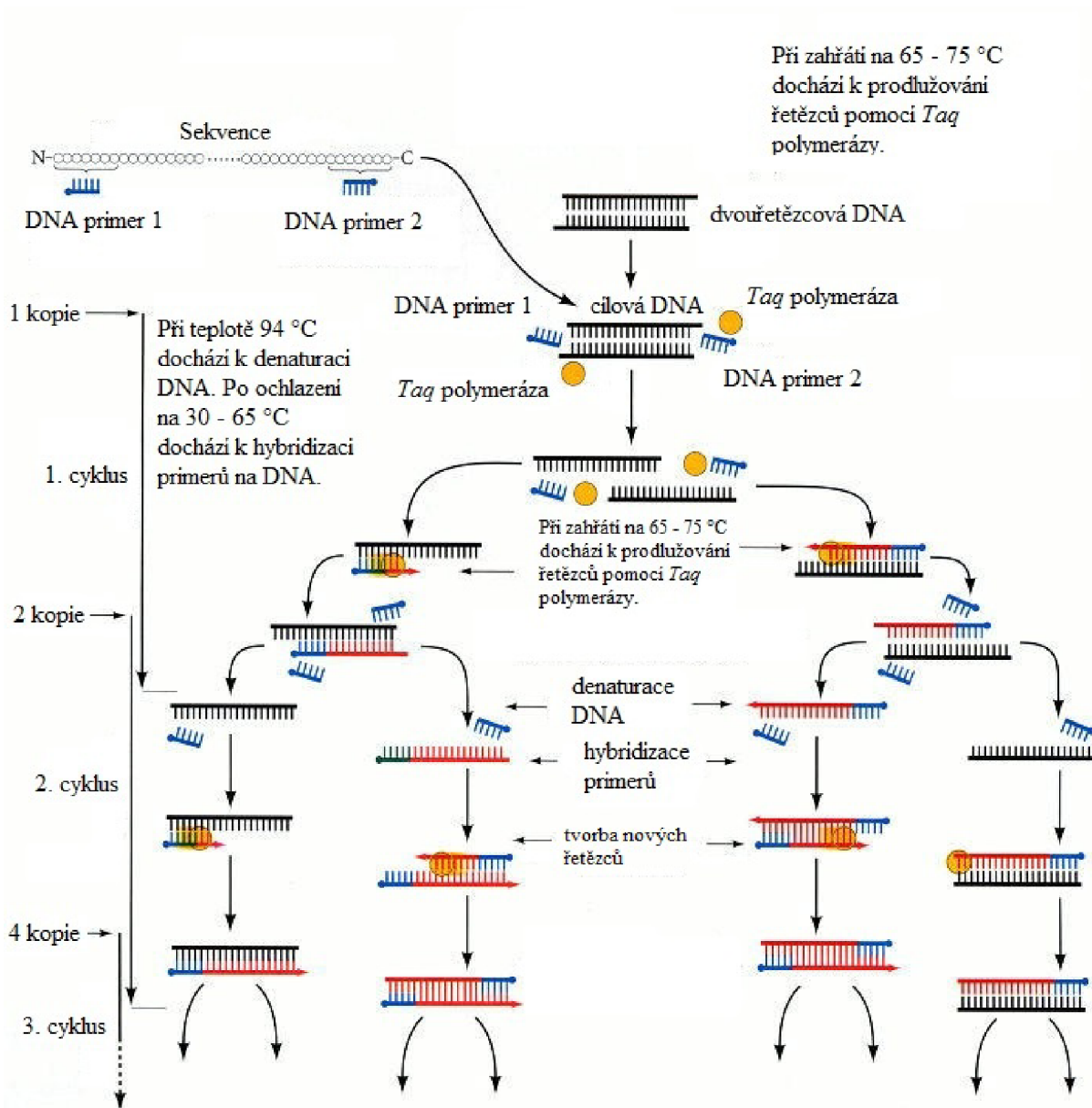
1. denaturace
2. připojení primerů
3. syntéza nového vlákna DNA

Denaturace: Směs je zahřívána na teplotu 94°C . Při této teplotě se poruší vodíkové můstky, které k sobě pojí dvě vlákna dvouřetězcové molekuly DNA, což způsobí, že molekula denaturuje. Teplota vhodná pro tuto reakci závisí na délce primeru a na zastoupení A – T a G – C párů (tři vodíkové můstky fixující G – C zvyšují stabilitu a tím denaturační teplotu).

Připojení primerů: Reakční směs je ochlazena na $30 - 65^\circ\text{C}$. Obě vlákna každé molekuly se mohou opět spojit, avšak většina z nich tak neučiní, protože směs obsahuje nadměrné množství krátkých molekul DNA zvaných oligonukleotidy nebo také primery, které se velmi rychle připojují na specifická místa molekuly DNA.

Syntéza nového vlákna DNA: Teplota se pohybuje kolem $65 - 75^\circ\text{C}$. Je optimální pro aktivitu enzymu, nazývaného *Taq*-polymeráza, který je ve směsi přítomen. V tomto kroku se polymeráza připojuje k jednomu konci každého primeru a syntetizuje nová vlákna DNA, komplementární k templátovým molekulám DNA.

Obvykle se pro amplifikaci používá 20 – 30 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství nově vytvořených molekul DNA oproti předcházejícímu cyklu zdvojnásobí. Tím pádem z jedné dvouřetězcové molekuly, se kterou byla reakce zahájena, vznikne více než 50 milionů nových dvouřetězcových molekul, z nichž každá je kopií úseku původní molekuly vymezeného místy, na která se připojily oba primery. Jelikož jeden cyklus trvá přibližně pět minut a protože byla celá technika zautomatizována, je nyní možno naklonovat fragment DNA během několika hodin. Výsledným produktem PCR jsou amplikony – úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp [51, 52, 53, 54, 55].



Obr. č. 13: Průběh polymerázové řetězové reakce [74]

2.3.2 Komponenty potřebné pro PCR směs

Pro namnožení specifického úseku DNA jsou potřebné následující komponenty: oligonukleotidové primery, DNA polymeráza, směs nukleotidů (dNTP), pufr s Mg^{2+} ionty, templátová DNA [54].

2.3.2.1 Primery

Primery jsou oligonukleotidy, které mají sekvenci komplementární k cílové jednořetězové DNA. Volba a návrh primerů je kritickým krokem pro úspěšnou amplifikaci specifické DNA sekvence [56].

Pro návrh vhodných primerů platí několik zásad, nejsou však universální, ale pouze orientační:

- zpravidla obsahují 18 – 24 nukleotidů
- neobsahují sekundární strukturu
- obsah 40 – 60 % G/C

- mají vyvážený poměr G/C a A/T párů
- nejsou vzájemně komplementární
- mají přijatelnou teplotu tání
- jejich optimální koncentrace je zpravidla 0,1 – 0,6 μM, vyšší koncentrace mohou vést ke vzniku nesespecifických produktů
- na 5'-konec je možné přidat nekomplementární báze, např. pro zavedení restrikčního místa [55, 57].

Délka primerů ovlivňuje rychlost hybridizace k templátu DNA. Dlouhé primery hybridizují pomaleji, z tohoto důvodu se v praxi primery delší než 30 nukleotidů téměř nepoužívají. Naopak pokud budou příliš krátké, mohou hybridizovat s jinými než cílovými místy a amplifikace povede k nežádoucím produktům.

Podmínky pro hybridizaci primerů závisí na zastoupení bází, délce oligonukleotidů a hodnotě T_m (teplota tání) produktu. Teplota pro připojení (hybridizaci) primerů (T_a) se stanoví podle vztahu:

$$T_a = 0,3 \times T_m^{\text{Primer}} + 0,7 \times T_m^{\text{Produkt}} - 25,$$

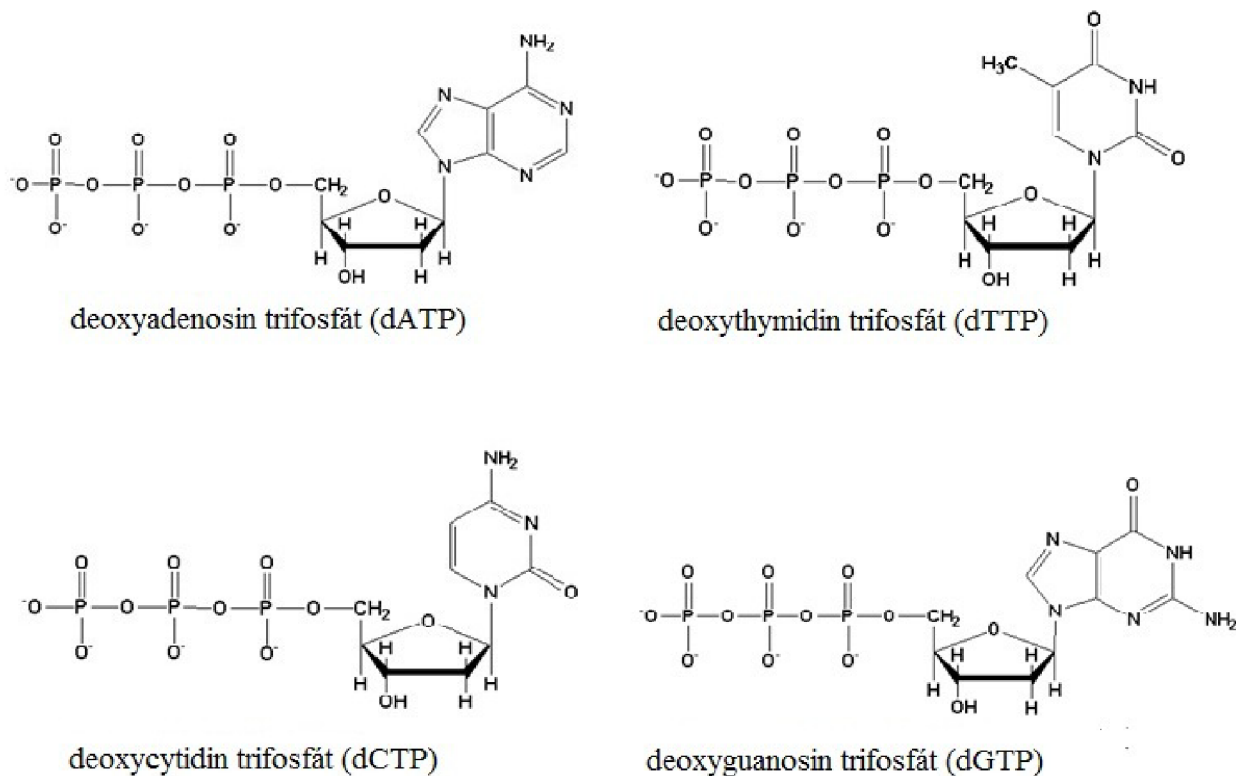
avšak obecně užívaným pravidlem pro stanovení T_a je snížení teploty T_m o 5 °C. Teplota T_a se obvykle pohybuje v rozmezí 55 až 68 °C po dobu 30 – 60 s [53].

2.3.2.2 DNA polymerázy

Polymerázová řetězová reakce využívá termostabilní DNA-polymerázu pro opakovanou syntézu obou vláken. Zpočátku plnila funkci replikázy při polymerázové řetězové reakci DNA-polymeráza I z *Escherichia coli*. Protože byl tento enzym během denaturačního kroku inaktivován teplotou, musel se ve třetím kroku každého cyklu opětovně přidávat čerstvý enzym. Hlavní vylepšení v PCR – amplifikaci DNA přišlo s objevem termostabilní DNA-polymerázy v termofilní bakterii *Thermus aquaticus*, která žije a rozmnožuje se při 70 – 80 °C. Tato polymeráza, nazývána *Taq*-polymeráza, zůstává během teplotně denaturačního kroku aktivní, z tohoto důvodu se nemusí přidávat po každém denaturačním cyklu. Místo toho se může dodat nadbytek *Taq* – polymerázy a oligonukleotidových primerů hned při přípravě směsi pro PCR a amplifikační cykly a kroky jsou řízeny pouze postupným střídáním teploty. Jednou z nevýhod PCR je, že se v nízké, ale významné četnosti, zanašují do amplifikovaných kopií DNA chyby. *Taq* – polymeráza má pouze 5' → 3' polymerázovou aktivitu a postrádá 3' → 5' korekční aktivitu a následkem toho produkuje při replikaci chyby s vyšší četností než je obvyklé. Když je začleněn nesprávný nukleotid během jednoho z prvních cyklů PCR, bude amplifikován zrovna tak jako jakýkoliv jiný nukleotid v sekvenci DNA. Pokud je požadována vysoká přesnost provádí se PCR s použitím teplotně stabilních polymeráz, které vykazují 3' → 5' korekční aktivitu, např. *Pfu* (z *Pyrococcus furiosus*) nebo *Tli* (z *Thermococcus litoralis*). Frekvence chyb je u těchto polymeráz 2 – 6krát nižší než u *Taq* – polymerázy, ale jejich rutinní použití je obtížné, protože jejich 3'-exonukleázová aktivita často způsobuje degradaci jednořetězových primerů. Druhou nevýhodou *Taq* – polymerázy je to, že úseky DNA delší než několik tisíc nukleotidových párů amplifikuje neúčinně. Jestliže je třeba amplifikovat dlouhé úseky, může se místo *Taq* – polymerázy použít *Tfl* – polymeráza z *Thermus flavus*, která amplifikuje fragmenty do velikosti okolo 35 kB. Fragmenty nad 35 kB nelze metodou PCR účinně amplifikovat [50, 51, 53, 54].

2.3.2.3 Směs nukleotidů (dNTPs)

Deoxyribonukleotidy slouží jako stavební monomery pro polymerázovou reakci. Směs připravená pro PCR reakci obsahuje ekvimolární množství dATP, dTTP, dCTP a dGTP v koncentraci 200 – 400 μM , při vyšších koncentracích začíná docházet k inhibici. Přítomnost a koncentrace dNTPs má vliv na funkci Mg^{2+} iontů. Pokud dojde ke snížení množství dNTPs, musí se snížit také koncentrace hořčičných iontů, jinak by došlo k jejich redukci a ke snížení polymerázové aktivity [57, 58].



Obr. č. 14: Deoxyribonukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) [75]

2.3.2.4 Pufř s Mg^{2+} ionty

Pufř zajišťuje optimální průběh reakce. Ionty Mg^{2+} jsou kofaktorem *Taq*-polymerázy a vytváří s jednotlivými dNTP rozpustný komplex, který je rozpoznávaný polymerázou. Ionty Mg^{2+} reagují také s primery, templátovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly. Nadbytek Mg^{2+} v reakční směsi zvyšuje výtěžnost PCR, na druhé straně ale dochází mnohem častěji k tvorbě nespecifických produktů. Optimální koncentraci iontů je třeba pro každou aplikaci stanovit empiricky [53, 58].

2.3.2.5 Templátová DNA

Templátová DNA obsahující cílovou sekvenci může být přidána do PCR směsi ve formě jedno- nebo dvouřetězcové. Používá se purifikovaná DNA nebo získaná z hrubých lyzátů buněk. Typická velikost amplifikovaných fragmentů se pohybuje kolem 100 – 1000 párů bází. Správný průběh a výtěžek PCR ovlivňuje: kvalita a čistota templátové DNA [58, 59].

2.3.3 Termocyklér

Termocyklér je programovatelný termostat, který musí přesně, reprodukovatelně udržovat tři inkubační teploty a být schopen přechodu mezi jednotlivými teplotami. V současné době existuje celá řada výrobců těchto přístrojů s různými typy temperace a chlazení [55, 57].

2.3.4 Přehled PCR metod

Rozvoj metod molekulární biologie znamenal možnost snazší identifikace mikroorganismu na rodové či druhové úrovni. Molekulární techniky založené na PCR jsou rychlé, snadné a poskytují preciznější výsledky při identifikaci kvasinek. Nejdůležitější molekulární metody používané při identifikaci kvasinek jsou založeny na variabilitě ribozomálních genů 5,8S, 18S a 26S. Mezi molekulární techniky založené na PCR, umožňující druhovou identifikaci kvasinek, jsou řazeny RFLP, RAPD, AFLP a DNA fingerprinting [60].

- **Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)** – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) představuje metodu pro charakterizaci celkové genomové DNA, která poskytuje vysoké rozlišení a dobrou reprodukovatelnost. Označuje se rovněž jako amplifikace vzácných restrikčních míst (IRS-PCR) nebo selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA podmíněná primerem (SRFA). Metoda je založena na amplifikaci fragmentu DNA pomocí PCR, který byl získán štěpením genomové DNA restrikčními endonukleázami. Počet výsledných amplikonů závisí na organismu a použitých primerech při PCR. Detekce AFLP fragmentů je uskutečněna pomocí radioaktivního nebo fluorescenčního značení jednoho ze dvou primerů [7, 53, 61].

- **Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)** – náhodná amplifikace polymorfni DNA. Technika je rychlá, snadná, dokáže produkovat dostatek polymorfni fragmentů. RAPD analýza je jedna z technik, které byly úspěšně použity k odhalení genetických variací. Metoda používá obvykle jeden nebo více krátkých primerů o délce 8 – 12 nukleotidů. Dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích chromozomové nebo plazmidové DNA. Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou (max. 2 000 bp) a rozdílným molárním množstvím. Umožňuje rozlišovat třídy a podtřídy kvasinek a zároveň i malé rozdíly mezi jednotlivými kmeny stejného druhu [7, 53, 62].

- **DNA fingerprinting** – metoda restrikční digesce a vizualizace specifických úseků DNA, označovaných jako minisatelity. Minisatelity jsou krátké, opakované sekvence o délce 10 – 60 bp. Jsou využívány jednoduché opakující se primery, např. (GAC)₅, (GTG)₅. Primer (GTG)₅ poskytuje větší rozlišení než primer (GAC)₅, čehož je využíváno při druhové identifikaci. Metoda PCR – fingerprinting umožňuje rozlišení kvasinek na úrovni druhů i poddruhů, může být tudíž využita k odlišení kvasinek náležících do skupiny *Saccharomyces sensu stricto* [7, 63].

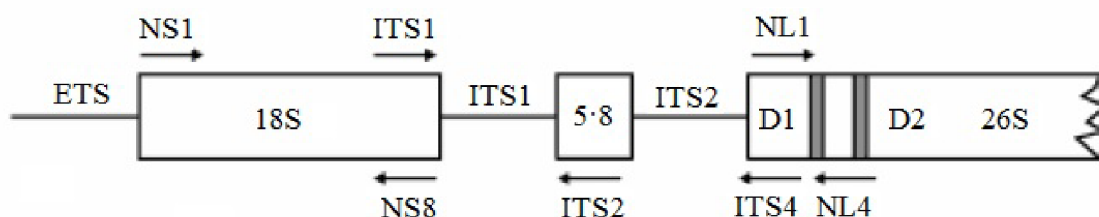
2.4 PCR – RFLP

PCR-RFLP je modifikace standardní PCR, kdy dochází k charakterizaci DNA pomocí jejího štěpení restrikčními endonukleázami na fragmenty. Jde o tzv. analýzu polymorfizmu délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism analysis), která má význam při konstrukci genomových map a také při studiu genetických chorob [52, 53, 64]. Polymorfismus vzniká na základě přítomnosti či nepřítomnosti rozpoznávacích a štěpných míst. Jejich podstatou jsou buď mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích

míst pro restriční endonukleázy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, delecí, inzercí nebo přestaveb ve specifických oblastech chromozómu.

Reakční směs pro štěpení PCR produktu se skládá z pufru pro restriční endonukleázu, restriční endonukleázy a příslušného množství destilované vody. Teplota inkubace (digesce) je stanovena dodavatelem konkrétní restriční endonukleázy, většinou 37 °C. Při digesci dochází k enzymatickému štěpení specifických míst sekvence DNA, které rozpoznává daný enzym. PCR-RFLP je metoda, kdy na základě restričních fragmentů, získaných štěpením DNA, dochází k identifikaci odlišností v DNA mezi jednotlivci v populaci. Počet a délka vzniklých fragmentů jsou pro každého jedince specifické. Podobnosti a odlišnosti mohou být využity k rozlišení druhů a kmenů. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením [53].

PCR-RFLP je schopna rozlišit druhy i kmeny kvasinek s vysokou přesností. Využívá se analýzy ribozomálních úseků. Uspořádání ribozomální DNA (rDNA) je zobrazeno na obr. č.15. Nachází se zde oblast 5,8S rRNA a variabilní zóna, kde můžeme vyhledat ITS oblast. K amplifikaci dochází v úseku mezi 18S rRNA a 26S rRNA. Využívá se specifických primerů ITS1 a ITS4. Restriční analýze je podrobena oblast 5,8S-ITS rDNA [65].



Obr. č. 15: Schéma rDNA [76]

2.4.1 Restriční endonukleázy

Restriční endonukleázy umožňují molekulárním biologům štěpit molekuly DNA přesným a reprodukovatelným způsobem. Objev těchto enzymů, za něž W. Arber, H. Smith a D. Nathans v roce 1978 dostali Nobelovu cenu, byl jedním z klíčových zlomů v rozvoji genetického inženýrství. Restriční endonukleázy používané v molekulární genetice pocházejí převážně z bakterií, a protože jsou jimi rozpoznávána místa na DNA krátká (obvykle 4 – 8 nukleotidových párů), je vysoká pravděpodobnost, že se tato místa náhodně vyskytnou v každé delší molekule DNA. Proto mohou být tyto enzymy využity pro analýzu DNA z jakéhokoli zdroje. V současné době je charakterizováno několik typů restričních endonukleáz, z nichž nejvýznamnější jsou II. typu. Je známo více než 3 500 těchto endonukleáz. Příklady jednotlivých restričních endonukleáz jsou uvedeny v tab. č. 2 [52, 53].

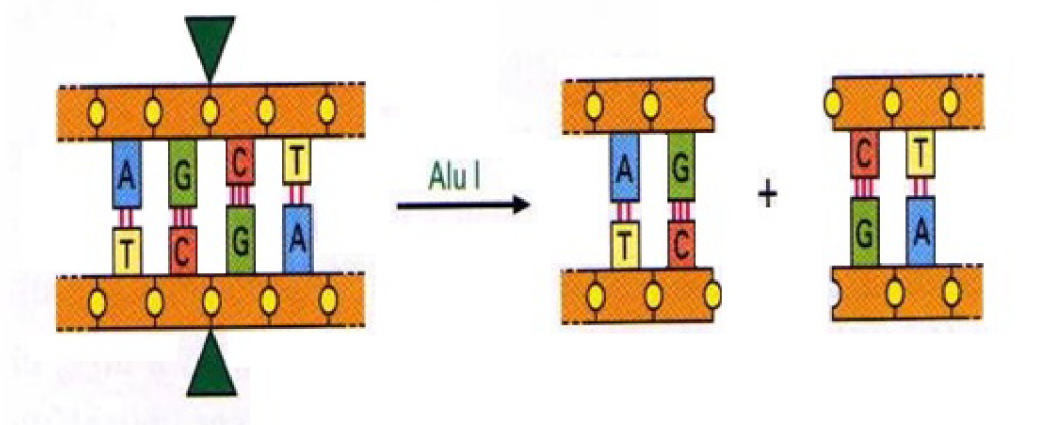
Nukleázy jsou enzymy, které štěpí, zkracují a degradují molekuly nukleových kyselin. Restriční endonukleázy však mají jednu zajímavou vlastnost, která je odlišuje od ostatních nukleáz – štěpí DNA pouze v místech se specifickou krátkou nukleotidovou sekvencí. K rozštěpení molekuly DNA dochází hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v restričním místě neboli místě štěpení, které se nachází uvnitř rozpoznávacího místa nebo těsně vedle něj. Produktem štěpení jsou úseky DNA o definované délce označované jako

restrikční fragmenty, které se detekují pomocí gelové elektroforézy. V závislosti na způsobu, jakým je místo štěpení rozštěpeno, vznikají restrikční fragmenty, které mohou být zakončeny:

- tupými (zarovnanými) konci
- 5'-jednořetězcovými přesahujícími konci
- 3'-jednořetězcovými přesahujícími konci

Názvosloví restrikčních endonukleáz se řídí určitými pravidly. Obecně je tvořeno třemi písmeny, které označují mikroorganismus, z kterého byl enzym izolován. V některých případech je rozšířeno o písmeno, které označuje kmen. V názvosloví se vyskytují také římské číslice, kterými se poté odlišuje více enzymů produkovaných jedním mikroorganismem. Názvosloví je názorně vysvětleno na následujícím příkladu: [53, 66].

*Bam*HI: *Bacillus amyloliquefaciens*, kmen *H*, enzym *I*



Obr. č. 16: Schématické znázornění štěpení molekuly DNA za použití restrikční endonukleázy *AluI* [51]

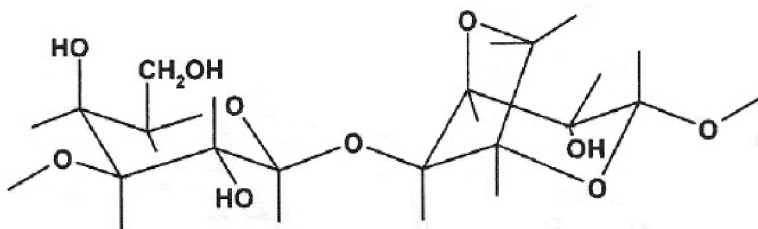
Tab. č. 2: Příklady jednotlivých restrikčních endonukleáz [67]

Restrikční endonukleáza	Produkční mikroorganismus	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↓ATC ... 3' 3' ... CTA↑G ... 5'
<i>Taq</i> ^o 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↓TTA ... 3' 3' ... AAT↑T ... 5'

2.5 Elektroforéza v agarózovém gelu

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám, je využívána k identifikaci, separaci a purifikaci fragmentů DNA. Technika je jednoduchá, rychlá a schopná rozlišit fragmenty DNA, které nemohou být jinak separovány. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě.

Elektroforéza probíhá na vhodném nosiči, kterým obvykle bývá gel. Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou. Gely vytváří složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. V našem případě využíváme pro separaci nukleových kyselin agarózový gel. Agaróza je polysacharid tvořený β -D-galaktopyranózou a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózou, které jsou spojeny glykosidovými vazbami (obr.č.16). [53, 54, 57, 58].



Obr. č. 17: Struktura agarózy [53]

Agarózový gel se připravuje rozvařením práškové agarózy v elektroforetickém pufru a ke ztuhnutí dochází za pokojové teploty. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti (100 bp – 50 kb), polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul (10 – 1000 bp). Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme horizontální a vertikální gelovou elektroforézu, které mají deskové uspořádání a dále kapilární elektroforézu, u níž je gel uvnitř kapiláry [53].

Volbou velikosti a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezech molekulových hmotností, viz. tab.č. 3.

Tab. č. 3: Rozmezí velikosti fragmentů DNA separovaných v agarózovém gelu o různé koncentraci [67]

Velikost fragmentů DNA	Koncentrace agarózy
1 – 20 kb	0,4 – 0,8 %
50 – 1000 bp	2 %
100 – 500 bp	3 %
10 – 100 bp	5 %

Po dokončení elektroforézy je třeba identifikovat polohy separovaných molekul DNA, které nejsou pouhým okem viditelné. Gel je obarven ethidium bromidem (často se nachází v gelu již během elektroforézy). Ethidium bromid je interkalační činidlo, které se váže mezi vlákna DNA a následně červeně fluoreskuje po ozáření UV světlem. Výsledkem jsou poté patrné proužky, tzv. bendy, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA. Namísto ethidium bromidu může být pro barvení nukleových kyselin použita také skupina fluorescenčních kyanidových barviv s komerčním označením SYBR. Pro posouzení velikosti jednotlivých fragmentů se používají markery molekulových hmotností, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA definovaných velikostí [54, 58].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky, suroviny a použité mikroorganismy

3.1.1 Chemikálie

- Sladina (pivovar Brno)
- Agar (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie)
- Agaróza pro elektroforézu DNA (SERVA, Německo)
- Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon spol.s.r.o., ČR)
- Ethidium bromid (SERVA, Německo)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tris (hydroxymethyl) aminomethan (SERVA, Německo)
- H₃BO₃ (Mach-chemikálie s.r.o., Ostrava)
- NaOH (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- CH₃COONa (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- HCl (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Na₂CO₃ (Lachema, Brno)
- *Taq* DNA polymeráza (KAPA BIOSYSTEMS, USA)
- 10× *Taq* pufr pro PCR mix (KAPA BIOSYSTEMS, USA)
- Primery ITS1, ITS4 (Invitek, Německo)
- dNTP mix (Invitek, Německo)
- Nanášecí pufr Loading buffer (Fermentas, Litva)
- Délkový standard 20 bp a 100 bp (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- Restrikční endonukleázy – *Hae*III, *Hinf*I, *Taq*^qI, *Alu*I, *Mse*I (Fermentas, Litva)
- Streptomycin sulphate (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie)
- Kyselina propionová
- Ethanol (Lach-Ner s.r.o., Neratovice)
- Parafinový olej (Penta, Praha)
- Sterilní a deionizovaná voda

3.1.2 Přístroje a pomůcky

- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- Centrifuga eppendorf 5417 R (Eppendorf AG, Německo)
- Vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR)
- Vortex-Genie 2, MO Bio (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)
- Termostat IP 100-U LTE SCIENTIFIC, (Velká Británie)
- Termocyklér PTC-100™, (MJ Research, Inc, USA)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci - AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR)
- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Elektroforetická vany - Owl separation systeme, model - B2, (Biotech s.r.o., ČR)
- Předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Zdroj napětí – SAVANT PS 250 (Biotech s.r.o., ČR)
- Zdroj napětí – Major Science MP 500P (Biotech s.r.o., ČR)

- Transluminátor (Ultra Lum. INC, USA)
- Software Scion Image (Biotech s.r.o., ČR)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Chladnička a mraznička k uchování vzorků DNA
- Parafilm (American Nacional Can™, USA)
- Exsikátor
- Mikrozukmavky Eppendorf
- Laboratorní sklo
- Mikroskop
- Software BioNumerics (Applied Maths, USA)
- Plastové Petriho misky
- Bakteriologické kličky
- Buničitá vata
- Stojan na zkumavky
- Zkumavky
- Kahan

3.1.3 Suroviny a použité mikroorganismy

Dodavatelem surovin bylo soukromé vinařství Holánek, které se nachází v obci Ivaň v mikulovské vinařské podoblasti. Surovinou, ze které došlo k izolaci čistých kultur kvasinek, byl vinný mošt z odrůdy Rulandské modré. Odběr vzorků byl proveden z ekologické vinice.

3.2 Odběry vzorků

Vzorky vinného moštu byly odebírány v pravidelných intervalech po dobu 3 týdnů. Přesná data odběrů jsou uvedena v tab. č. 4. Odběry byly prováděny přímo ve vinném sklepě, aby došlo k dodržení klimatických podmínek a nebyl narušen růst kvasinek. Vzorky byly odebírány do předem vysterilizovaných sklenic s víčkem, převáženy v chladičím boxu a tentýž den zpracovány.

Tab. č. 4: Přesná data jednotlivých odběrů vzorků vinného moštu

Číslo odběru	Datum odběru
1.	11.10.2010
2.	13.10.2010
3.	15.10.2010
4.	18.10.2010
5.	20.10.2010
6.	22.10.2010
7.	25.10.2010
8.	29.10.2010

3.3 Příprava kultivačních médií

3.3.1 Příprava sladinového kultivačního média

Sladinový extrakt byl použit jako kultivační médium pro růst a rozmnožování kvasinek. Příprava byla následující. Do odměrného válce (500 ml) bylo nalito 200 ml sladinového extraktu a poté byl roztok zředěn vodou na cukernatost 7 °ČNM. Pomocí uhličitanu sodného

bylo upraveno pH na 6,8. Připravený roztok byl nalit do Erlenmayerových baněk, do kterých byl přidán agar, takto vzniklá směs byla promíchána varem a 20 minut sterilizována. Po vychladnutí na 60 °C bylo přidáno antibiotikum (250 µg·l⁻¹) proti nežádoucímu růstu bakterií a kyselina propionová (0,25 ml·l⁻¹) proti růstu plísní. Médium bylo následně nalito do Petriho misek. Na celou plochu agarů v Petriho misce byly naočkovány kvasinky, které byly tímto způsobem kultivovány v termostatu po dobu tří dnů při teplotě 26 °C.

3.3.2 Příprava šikmých agarů

Rozvařená sladina byla nalita do ¼ objemu zkumavky, ty byly poté zazátkovány a vysterilizovány v tlakovém hrnci po dobu 20 minut. Po vytáhnutí z hrnce byly zkumavky se sladinou ponechány ke ztuhnutí v šikmé poloze při laboratorní teplotě.

3.4 Příprava chemikálií

3.4.1 Příprava 10×TBE pufru

Nejprve byl připraven 0,5 M roztok EDTA. Bylo naváženo 9,36 g EDTA a převedeno do 50 ml odměrné baňky. Roztok EDTA byl přídavkem 0,5% roztoku NaOH upraven na hodnotu pH 8. Z připraveného roztoku bylo odebráno 40 ml a přeneseno do 1000 ml odměrné baňky. Dále bylo přidáno 108 g Tris a 55 g H₃BO₃. Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Tímto postupem byl získán zásobní roztok 10×TBE pufru.

3.4.2 Příprava 1×TBE pufru

Ze zásobního roztoku bylo odebráno 100 ml a přeneseno do 1000 ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Roztok 1×TBE pufr byl použit k přípravě gelů.

3.4.3 Příprava 1×TBE pufru s ethidium bromidem

Bylo přidáno 100 µl ethidium bromidu k připravenému roztoku 1×TBE pufru v 1000 ml odměrné baňce. Tento roztok byl použit jako vodivostní pufr při elektroforetické detekci DNA fragmentů.

3.4.4 Příprava ethidium bromid (EtBr)

10 mg ethidium bromidu bylo naváženo do mikrozkušavky a rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Tímto postupem vznikl roztok o koncentraci 10 mg·l⁻¹. Ethidium bromid byl použit pro vizualizaci fragmentů DNA na gelu. Při práci s ethidium bromidem bylo nutné dodržovat bezpečnostní předpisy.

3.4.5 Příprava 3 M octanového pufru

Bylo naváženo 2,46 g CH₃COONa a rozpuštěno v destilované vodě. pH bylo upraveno na hodnotu 5,5 pomocí koncentrované HCl. Roztok byl kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

3.4.6 Příprava 2% agarózového gelu

Na přípravu 2% agarózového gelu byly do Erlenmayerovy baňky naváženy 3 g agarózy a zality 150 ml 1×TBE pufru. Následně byla směs dokonale rozvařena v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza úplně nerozpustila, poté se nechala směs vychladnout. Dle velikosti použité elektroforetické vany bylo v odměrném válci odměřeno přesné množství agarózy a bylo přidáno fluorescenční barvivo ethidium bromid, dle objemu agarózy. Vše bylo důkladně promícháno a nalito do předem vyvážené elektroforetické vany. Do nalitého gelu byly vloženy hřebeny pro vytvoření jamek na nanášení jednotlivých vzorků. Gel byl ponechán 30 minut při laboratorní teplotě a poté ještě v chladničce do úplného ztuhnutí.

3.4.7 Příprava délkových standardů

3.4.7.1 100 bp

Délkový standard 100 bp byl připraven smícháním 10,9 µl sterilní vody, 2,5 µl nanášecího pufru a 1,6 µl roztoku 100 bp. Z připraveného roztoku bylo na gel nanášeno 6 µl.

3.4.7.2 20 bp

Délkový standard 20 bp byl připraven smícháním 4,25 µl sterilní vody, 1 µl nanášecího pufru a 0,75 µl roztoku 20 bp. Připravený délkový standard byl nanášen na gel v množství 6 µl.

3.4.8 Příprava 80% ethanolu

80% roztok ethanolu byl připraven smícháním 1,6 ml 96% ethanolu s 0,32 ml destilované vody. Roztok byl skladován v mrazničce při teplotě – 20 °C. Roztok 80% ethanolu byl používán k přečištění PCR produktu, společně s 96% roztokem ethanolu. Komerčně dostupný 96% roztok ethanolu byl pouze vychlazen na teplotu – 20 °C.

3.4.9 Příprava PCR směsi

PCR směs, tzv. mastermix byl připraven smícháním jednotlivých komponent v přesně stanoveném pořadí, pro každý vzorek DNA v množství 150 µl.

1. Sterilní voda	125,4 µl
2. Pufr	15 µl
3. dNTP mix	3 µl
4. Primer ITS1	1,5 µl
5. Primer ITS4	1,5 µl
<hr/>	
6. Templátová DNA	3 µl
7. <i>Taq</i> DNA polymeráza	0,6 µl

Podle stanoveného pořadí byly nejdříve smíchány komponenty 1. až 5. Jejich množství bylo vynásobeno počtem vzorků. Směs byla promíchána na vortexu a rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek. Do takto připravené směsi byly napipetovány 3 µl templátové DNA a 0,6 µl *Taq* DNA polymerázy.

Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem, ale templátová DNA byla nahrazena 3 µl sterilní vody.

3.5 Pracovní postupy

3.5.1 Izolace kvasinek z vinného moštu

Ve sterilním boxu byly vzorky vinného moštu promíchány a poté přefiltrovány přes bakteriologické filtry. Ty byly následně pomocí pinzety přeneseny na misky se sladinou. Takto připravené Petriho misky byly kultivovány v termostatu při 26 °C po dobu 5 – 7 dnů. Získané kultury byly několikrát přečištěny Kochovou zřed'ovací metodou.

3.5.2 Kochova zřed'ovací metoda

Kochova zřed'ovací metoda byla modifikována a použita k získání čistých kultur kvasinek z kultur směsných, které narostly během kultivace v termostatu. Ve sterilním očkovacím boxu byly přichystány tři zkumavky, do prvních dvou zkumavek bylo napipetováno 10 ml sterilní vody a do třetí zkumavky pouze 9 ml sterilní vody. Z Petriho misky s narostlou směsnou kulturou byla odebrána dvě očka pomocí bakteriologické kličky a přenesena do první zkumavky. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu a poté bylo ze zkumavky odebráno 50 µl směsi a přeneseno do druhé zkumavky. Opět bylo vše důkladně promícháno na vortexu. Ze vzniklé suspenze byl odpipetován 1 ml a přenesen do třetí zkumavky s 9 ml sterilní vody. Po promíchání bylo odpipetováno 30 µl a přeneseno na Petriho misku se sladinou. Poté byl pomocí bakteriologické kličky proveden křížový roztěr. Misky byly inkubovány 2 – 3 dny při teplotě 26 °C. Po kultivaci byly jednotlivé kolonie přeočkovány na novou Petriho misku tak, že byly rozetřeny po celé ploše a opět kultivovány v termostatu. Postup byl opakován nejméně 6krát, než došlo k získání čistých kultur kvasinek. Čisté kultury byly kontrolovány pomocí mikroskopu. Čisté kultury byly přeočkovány na šikmé agary, přelity sterilním parafinovým olejem a uloženy v chladničce.

3.5.3 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena ve sterilním boxu pomocí komerčního setu UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit. Byly nachystány rozbíjecí zkumavky, do kterých bylo napipetováno 300 µl rozbíjecího pufru, ve kterém byla následně rozsuspendována dvě očka kvasinkové kultury. Ke směsi bylo přidáno 50 µl roztoku MD1, mikrozkumavky byly vloženy v horizontální poloze do adaptéru vortexu a při maximální rychlosti byly po dobu 10 minut vortexovány. Poté byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 10 000×g. Supernatant byl přenesen do předem připravené čisté mikrozkumavky a bylo k němu přidáno 100 µl MD2. Vzorky byly zvortexovány a inkubovány po dobu 5 minut při 4 °C. Poté byly opět centrifugovány 1 minutu při 10 000×g. Supernatant byl odpipetován do čisté mikrozkumavky, k roztoku bylo přidáno 900 µl MD3 a směs byla zvortexována. Z takto vzniklého roztoku bylo odpipetováno 700 µl na kolonku a centrifugováno 1 minutu při 10 000×g. Následně byl přefiltrovaný roztok odstraněn a na tutéž kolonku byl přenesen zbytek roztoku a došlo k opětovné centrifugaci vzorku po dobu 1 minuty při 10 000×g. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a do kolonky bylo přidáno 300 µl roztoku MD4. Po centrifugaci (1 minuta při 10 000×g) byla kolonka opatrně přenesena do čisté mikrozkumavky a do středu bílé membrány uvnitř kolonky bylo napipetováno 50 µl MD5. Došlo k centrifugaci (1 minuta při 10 000×g), poté byla kolonka odstraněna a roztok DNA v mikrozkumavce byl přichystán pro další aplikace. DNA byla uchována v mrazničce při – 20 °C.

3.5.4 Průběh PCR reakce

PCR směs byla připravena dle postupu uvedeného v kapitole 3.4.9, zvortexována a umístěna do termocykléru. Polymerázová řetězová reakce probíhá ve třech opakujících se krocích: denaturace, připojení primerů a syntéza nového vlákna DNA. Teplotní a časový profil PCR reakce je popsán v tab. č. 6.

Tab. č. 6: Teplotní a časový profil PCR reakce popsáný v jednotlivých krocích

Kroky PCR reakce	Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace DNA	94	4
Připojení primerů (annealing)	94	1
	48	0,5
	72	1
Syntéza nového vlákna DNA (elongace)	72	10

3.5.5 Elektroforetická detekce produktu PCR reakce

K detekci PCR produktů byla použita horizontální elektroforéza. Rozvařený 2% agarózový gel byl nalit do předem připravené a vyvážené elektroforetické vany. Pro vytvoření jamek byly do gelu vloženy hřebínky. Po ztuhnutí a odstranění hřebíků byla elektroforetická vana s gelem zalita pracovním roztokem TBE s ethidium bromidem. V dalším kroku došlo k přípravě vzorků následujícím způsobem. Na parafilm byl nanesen 1 µl nanášecího pufru (Loading buffer), který byl smíchán s 5 µl naamplifikované DNA. Z této promíchané směsi bylo 5 µl pipetováno do jamky na gelu. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem a nanášena ve stejném množství. Délkový standard byl vnesen po okrajích gelu v množství 6 µl. Poté byla elektroforetická vana připojena ke zdroji napětí. Podle počtu analyzovaných vzorků byly použity různé velikosti van. Elektroforetická detekce PCR produktů probíhala přibližně 4 hodiny. V následující tabulce (tab.č. 7) jsou uvedeny důležité údaje pro jednotlivé elektroforetické vany.

Tab. č. 7: Údaje pro jednotlivé elektroforetické vany

Délka gelu [cm]	Množství gelu [ml]	Množství EtBr [µl]	Napětí zdroje [V/cm]
14 - velká vana	70	7	4,5 – 5
11 - střední vana	50	5	4,5 – 5
8,5 - malá vana	30	3	4,5 – 5

Analyzované fragmenty DNA byly zviditelněny za použití UV transluminátoru a gel byl vyfocen programem Scion Image.

3.5.6 Přečištění PCR produktu

Získaný PCR produkt bylo nutné před restriční analýzou přečistit. Byl zvolen níže popsáný způsob. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 20 µl naamplifikované DNA, ke které byly přidány 2 µl octanového pufru. Směs byla zvortexována a dále k ní bylo přidáno 60 µl 96% ethanolu vychlazeného na teplotu – 20 °C. Poté následovala centrifugace po dobu 30 minut při 4 °C a 15 000 otáčkách. Supernatant byl dekantován a do mikrozkušavky bylo

přidáno 60 µl 80% ethanolu, také vychlazeného na –20 °C. Následovala centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Supernatant byl dekantován a zbytky ethanolu byly vysušeny v exsikátoru po dobu 15 minut.

3.5.7 Restrikční analýza

Směs pro restrikční analýzu byla připravena ve sterilním boxu za podmínek definovaných výrobcem. Do každé mikrozkušavky s přečištěnou DNA bylo napipetováno 13 µl sterilní vody, 1,5 µl pufru a 0,5 µl enzymu. Směs pro restrikční analýzu byla připravena ve větším množství, které odpovídalo násobku počtu vzorků, dále byla promíchána na vortexu a rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek. Vzorky byly inkubovány v termocykléru při 37 °C po dobu 16 hodin (+ 20 minut inkubace), tento režim byl nastaven u všech použitých restrikčních enzymů, viz. tab. č. 8. Vzniklé fragmenty byly detekovány pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu, kde však místo negativní kontroly, byla vynášena pozitivní kontrola. Jako pozitivní kontrola byly na gel nanášeny PCR produkty o délce shodující se s délkou ampliconu, který byl použitý pro restrikční analýzu. Elektroforetická detekce probíhala přibližně 2 hodiny. Analyzované fragmenty DNA byly opět zviditelněny za použití UV transluminátoru a gel byl vyfocen programem Scion Image.

Tab. č. 8: Teplotní režimy použitých restrikčních endonukleáz

Označení enzymu	Teplota inkubace (°C) – 16 hodin	Teplota inaktivace (°C) – 20 minut
<i>Hae</i> III	37	82
<i>Hinf</i> I	37	80
<i>Taq</i> ^o I	37	80
<i>Ahl</i> I	37	65
<i>Mse</i> I	37	65

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo identifikovat a taxonomicky zařadit vinné kvasinky pomocí metody PCR-RFLP. V experimentální části byl zpracován mošt červeného vína odrůdy Rulandské modré, která byla pěstována dle zásad ekologického zemědělství. Identifikace a taxonomické zařazení vzorků bylo provedeno porovnáním elektroforeogramů s typovými kvasinkami. Jako typové kvasinky byly použity kvasinky pocházející ze sbírky CCY (Bratislava, SR), které byly zpracovány v předchozích diplomových pracích [68, 69]. Pro posouzení genetické podobnosti slouží vytvořené dendrogramy, které se nachází v kapitole 4.5.

4.1 Izolace kvasinkové DNA

Z hlediska většího počtu vzorků byla k izolaci kvasinkové DNA zvolena komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit. Ve srovnání s fenolovou extrakcí je použití komerční sady časově méně náročné a z hlediska čistoty izolované DNA výhodnější. Vyizolovaná DNA byla uchovávána při teplotě – 20 °C a následně využita k amplifikaci.

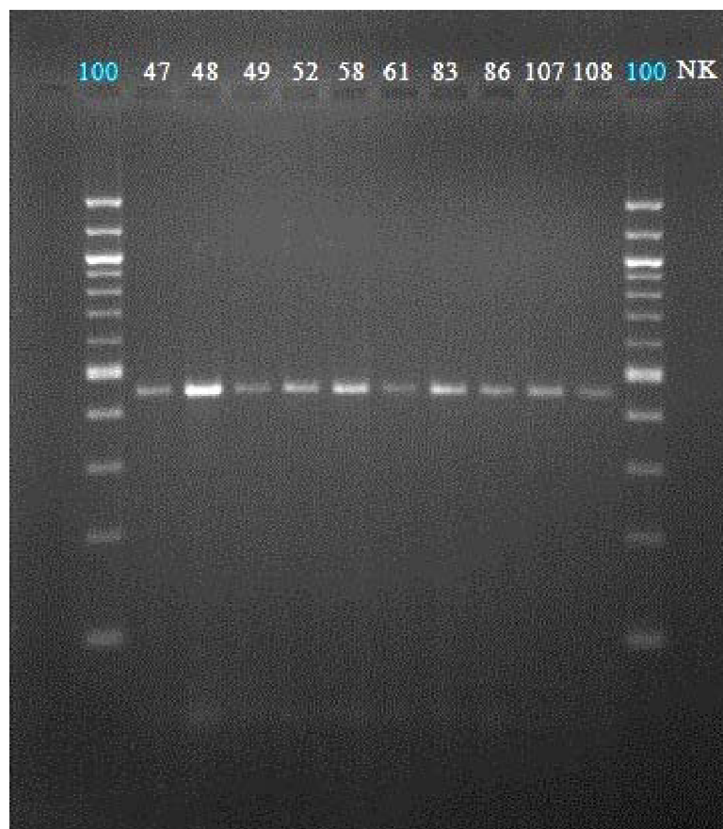
4.2 Amplifikace DNA pomocí metody PCR

Cílová sekvence, kódující oblast 5,8S-ITS rDNA, byla naamplifikována za použití primerů ITS1 a ITS4. Sekvence primerů je uvedena v tab. č. 9. PCR produkty byly elektroforeticky detekovány na 2% agarózovém gelu a porovnány s délkovým standardem. Pro kvalitní rozdělení délkového standardu a přesnější odečtení délek PCR fragmentů bylo potřebné optimalizovat podmínky elektroforézy. Elektroforetické dělení PCR produktů na 2% agarózovém gelu probíhalo zhruba 4 hodiny. Pro ověření čistoty použitých PCR komponent a sterility práce byla použita negativní kontrola. Velikost PCR produktu byla nejprve stanovena odečtením z elektroforeogramu a následně také určena pomocí programu BioNumerics.

Tab. č. 9: Sekvence použitých primerů

Sekvence primerů	
ITS1	5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'
ITS4	5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'

Amplifikace s využitím primerů ITS1 a ITS4 byla úspěšná u všech vzorků. Po amplifikaci DNA pomocí PCR byla elektroforeticky zjištěna délka fragmentu a podle délky fragmentu byly identifikované kvasinky rozděleny do šesti skupin: 410 bp, 450 bp, 480 bp, 500 bp, 750 bp a 880 bp. Velikosti PCR produktů pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v příloze 1. Ukázka elektroforeogramu PCR produktů vzorků je na obr. č. 18., ostatní výsledky PCR jsou v příloze 2.



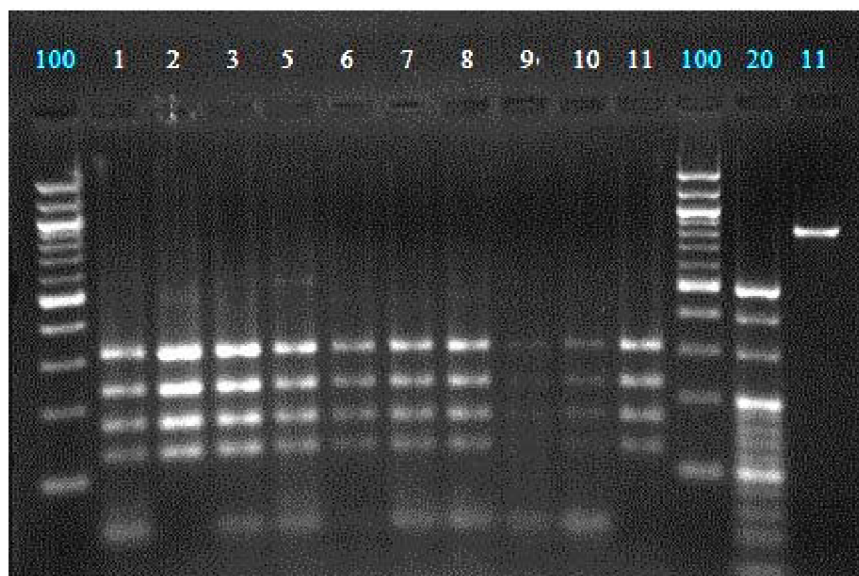
Obr. č. 18: Elektroforeogram PCR produktů vzorků, o velikosti fragmentu 450 bp, které byly amplifikovány primery ITS1 a ITS4. Označení (47-108) - analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, NK – negativní kontrola.

4.3 Restrikční analýza kvasinek pomocí metody PCR-RFLP

Naamplifikovaná DNA byla v dalším kroku použita pro restrikční analýzu. Vzorky DNA byly přečištěny ethanolem, aby došlo k odstranění přebytečných složek PCR směsi, k získání čisté DNA a byl zajištěn správný průběh reakce. V následujících experimentech byla DNA naštipána na specifické fragmenty pomocí těchto pěti restrikčních endonukleáz – *HaeIII*, *HinfI*, *Taq^I*, *AluI* a *MseI*. U všech použitých enzymů jsou na elektroforeogramu vyneseny kromě jednotlivých vzorků DNA také délkové standardy (100 bp a 20 bp) a tzv. pozitivní kontrola, kdy se jedná o PCR produkty vzorků kvasinek. Pozitivní kontrola slouží jako ukazatel, zda došlo ke štěpení vzorku příslušným enzymem. Podmínky digesce a postup práce je uveden v kapitole 3.5.7. Identifikace jednotlivých vzorků byla uskutečněna prostřednictvím porovnání délek restrikčních fragmentů s délkami restrikčních fragmentů typových kvasinek.

4.3.1 Analýza restrikční endonukleázou *HaeIII*

První z použitých restrikčních endonukleáz byl enzym *HaeIII*. Tato restrikční endonukleáza rozpoznává a štěpí místo 5'... GG↓CC ... 3' DNA. Délky fragmentů jednotlivých vzorků jsou pro svoji rozsáhlost shrnuty v příloze 3. Dále je také, na obr. č. 19, uveden elektroforeogram štěpení PCR produktů pomocí enzymu *HaeIII*. V příloze 4 se nachází další ukázky elektroforeogramů štěpení PCR produktů.



Obr. č. 19: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *HaeIII* v 2% agarózovém gelu. Označení (1-11) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorek 11).

Z elektroforeogramu v příloze 4 je patrné, že vzorek s pracovním označením 4 nebyl štěpen pomocí *HaeIII*, a je zřejmé, že neobsahuje štěpné místo pro tento restriční enzym. U zbývajících vzorků došlo ke štěpení.

Na základě štěpení restriční endonukleázou *HaeIII* bylo možné rozdělit vzorky o velikosti PCR produktu 450 bp na tři skupiny: 300+80+50 bp, 380+80 bp a 320+80+50 bp. U velikosti PCR produktu 480 bp byla štěpením získána jedna skupina, která má fragmenty délky 340+90+50 bp.

PCR produkt 500 bp je zastoupen pouze jediným vzorkem, který byl štěpen na dva fragmenty délky 390+100 bp.

Vzorky o velikosti PCR produktu 750 bp byly rozděleny na dvě skupiny, které zahrnují fragmenty délky 450+200+120 bp a 620+90 bp.

V minulých letech bylo potvrzeno, že vzorky o velikosti PCR produktu 880 bp jsou štěpeny námi použitými restričními endonukleázami naprosto totožně, a proto jsou dále analyzovány jinou metodou v rámci diplomové práce na téma *Taxonomické zařazení kvasinek rodu Saccharomyces*.

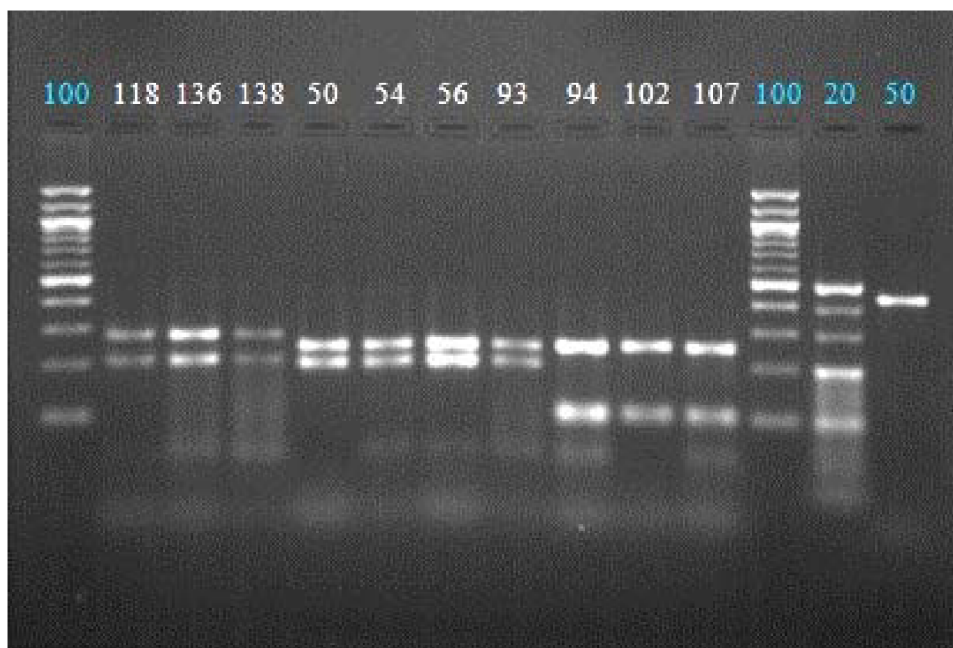
4.3.2 Analýza restrikční endonukleázou *Hinf*I

Restrikční endonukleáza *Hinf*I, která byla použita ke štěpení PCR produktů, rozpoznává a štěpí místo 5'... G↓ATC ... 3' DNA. Fragmenty získané po štěpení enzymem *Hinf*I jsou zrekapitulovány v tab. č. 10. Níže na obr. č. 20 je zobrazen elektroforeogram štěpení PCR produktů. Další ukázky elektroforeogramů jsou uvedeny v příloze 5.

Tab. č. 10: Souhrnná tabulka velikostí fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *Hinf*I. PO – pracovní označení vzorku, DP – délka PCR produktu, RF – velikost restrikčního fragmentu.

PO	DP (bp)	RF (bp)
4	410	210+200
47	450	250+100+60
48	450	250+100+60
49	450	250+100+60
50	450	250+200
51	450	250+100
52	450	250+100+60
54	450	250+200
55	450	250+200
56	450	250+200
57	450	250+100
58	450	250+100+60
61	450	250+100+60
65	450	250+100+60
71	450	250+100
74	450	250+200
76	450	250+100
83	450	250+100+60
85	450	250+100+60
86	450	250+100+60
88	450	250+100

PO	DP (bp)	RF (bp)
93	450	250+200
94	450	250+100+60
102	450	250+100
107	450	250+100+60
108	450	250+100+60
130	450	250+100
77	480	280+200
82	480	280+200
84	480	280+200
98	480	280+200
100	480	280+200
103	480	280+200
104	480	280+200
118	480	280+200
136	480	280+200
137	480	280+200
138	480	280+200
128	500	220+150+50
12	750	370+350
18	750	370+350
111	750	370+350



Obr. č. 20: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Hin*I v 2% agarózovém gelu. Označení (50-138) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorek 50).

U všech analyzovaných vzorků bylo štěpení pomocí restriční endonukleázy *Hin*I úspěšné. Z elektroforeogramu, který je uveden v příloze 5, je patrné, že vzorek č. 4 byl štěpen na dva fragmenty délky 210+200 bp.

Početná skupina vzorků, o velikosti PCR produktu 450 bp, nebyla štěpena stejným způsobem. Po restriční analýze se tato skupina rozdělila na tři s délkou restričních fragmentů: 250+100 bp, 250+200 bp a 250+100+60 bp.

Štěpné místo bylo i u všech vzorků o velikosti PCR produktu 480 bp. Došlo k rozdělení na restriční fragmenty délky 280+200 bp.

Jediný vzorek o velikosti PCR produktu 500 bp byl štěpen na tři fragmenty délky 220+150+50 bp.

PCR produkty délky 750 bp byly pomocí enzymu *Hin*I rozděleny na dva restriční fragmenty délky: 370+350 bp.

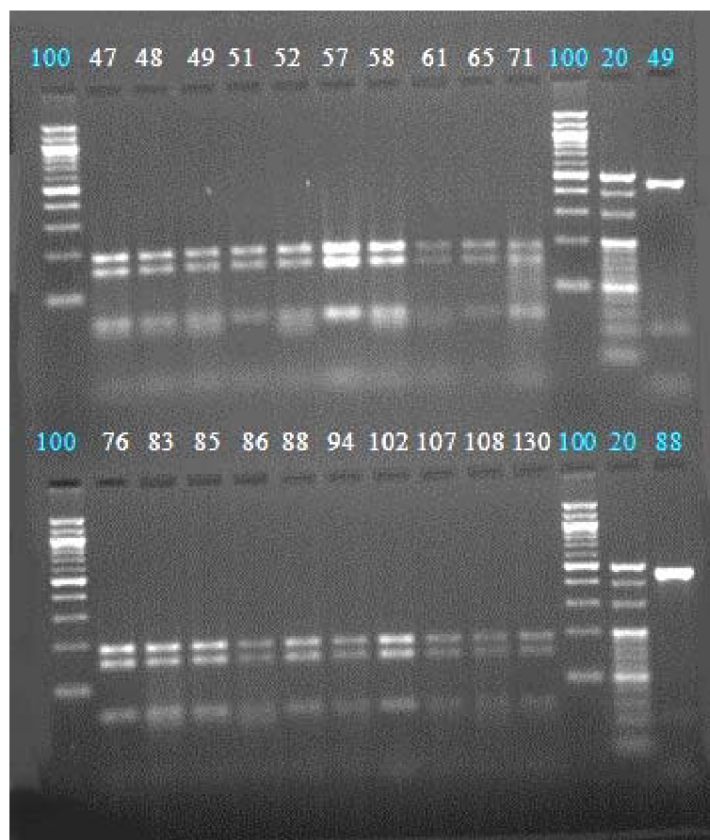
4.3.3 Analýza restrikční endonukleázou *Taq^I*

Restrikční endonukleáza *Taq^I* rozpoznává a štěpí místo 5' ... T↓CGA ... 3' DNA. Délky fragmentů získaných štěpením tímto enzymem jsou uvedeny v tab. č. 11. Ukázky štěpení enzymu *Taq^I* pro jednotlivé vzorky jsou na obr. č. 21 a v příloze 6.

Tab. č. 11: Souhrnná tabulka velikostí fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *Taq^I*. PO – pracovní označení vzorku, DP – délka PCR produktu, RF – velikost restrikčního fragmentu.

PO	DP (bp)	RF (bp)
4	410	260+150
47	450	180+160+60+50
48	450	180+160+60+50
49	450	180+160+60+50
50	450	200+160+70
51	450	180+160+60
52	450	180+160+60+50
54	450	200+160+70
55	450	160+120+70+60
56	450	200+160+70
57	450	180+160+60
58	450	180+160+60+50
61	450	180+160+60+50
65	450	180+160+60+50
71	450	180+160+60
74	450	160+120+70+60
76	450	180+160+60
83	450	180+160+60+50
85	450	180+160+60
86	450	180+160+60
88	450	180+160+60

PO	DP (bp)	RF (bp)
93	450	200+160+70
94	450	180+160+60
102	450	180+160+60
107	450	180+160+60
108	450	180+160+60
130	450	180+160+60
77	480	220+160+60+40
82	480	220+160+60+40
84	480	220+160+60+40
98	480	220+160+60+40
100	480	220+160+60+40
103	480	220+160+60+40
104	480	220+160+60+40
118	480	220+160+60+40
136	480	220+160+60+40
137	480	220+160+60+40
138	480	220+160+60+40
128	500	220+120+60
12	750	420+330
18	750	420+330
111	750	420+280



Obr. č. 21: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Taq*^I v 2% agarózovém gelu. Označení (47-130) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 49, 88).

PCR produkt 410 bp je zastoupen pouze jediným vzorkem, který byl štěpen na dva fragmenty délky 260+150 bp.

Pomocí enzymu *Taq*^I byly vzorky o velikosti PCR produktu 450 bp rozděleny do čtyř různých skupin podle délek restričních fragmentů: 180+160+60 bp, 180+160+60+50 bp, 200+160+70 bp a 160+120+70+60 bp.

Štěpením PCR produktů 480 bp enzymem *Taq*^I byla získána jedna skupina, která má délky fragmentů 220+160+60+40 bp.

Vzorek (s pracovním označením 128) o velikosti PCR produktu 500 bp byl štěpen na tři restriční fragmenty délky 220+160+60 bp.

Amplifikované produkty délky 750 bp byly pomocí enzymu *Taq*^I rozděleny na dvě skupiny: 420+330 bp a 420+280 bp.

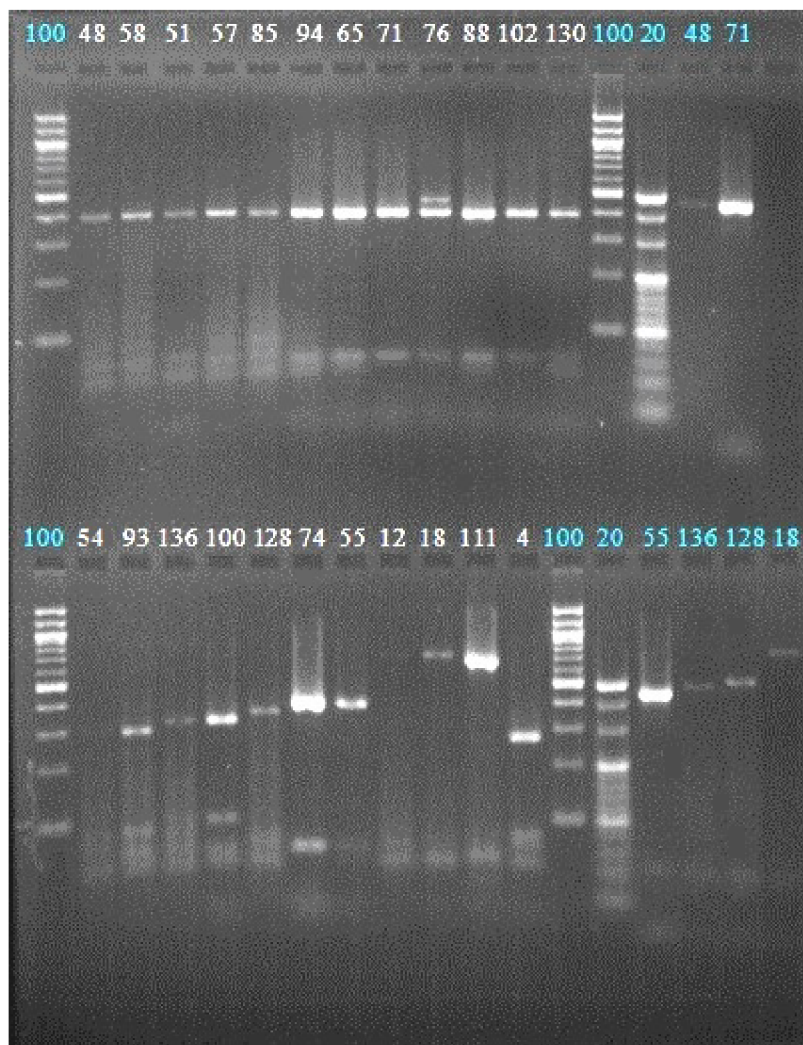
4.3.4 Analýza restriční endonukleázou *AluI*

Enzym *AluI* byl zvolen jako další restriční endonukleáza. Enzym *AluI* rozpoznává a štěpí místo 5'... AG↓CT ... 3' DNA. Po analýze restričních fragmentů programem BioNumerics (viz. kapitola 4.5), bylo přistoupeno k redukci počtu námi analyzovaných vzorků. Důvodem je jejich 100% podobnost v dané skupině. V rámci restriční analýzy pomocí enzymů *HaeIII*, *HinfI* a *Taq^I* bylo zjištěno, že skupina vzorků (51, 57, 71, 76, 88, 102 a 130) se nejvíce na elektroforeogramech naprosto totožná a z tohoto důvodu byla restriční analýza pomocí enzymu *AluI* provedena u všech vzorků. Z důvodů neúspěšného štěpení byla restriční analýza u vzorků 12, 18 a 54 provedena podruhé. Výsledek štěpení pro jednotlivé vzorky je shrnutý v tab. č. 12. Elektroforeogram štěpení PCR produktů je uveden na obr. č. 22.

Tab. č. 12: Souhrnná tabulka velikostí fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou *AluI*. PO – pracovní označení vzorku, DP – délka PCR produktu, RF – velikost restričního fragmentu.

PO	DP (bp)	RF (bp)
4	410	280+80+50
48	450	400+50
51	450	400+50
54	450	300+100+50
55	450	400+50
57	450	400+50
58	450	400+50
65	450	400+50
71	450	400+50
74	450	400+50
76	450	400+50
85	450	400+50

PO	DP (bp)	RF (bp)
88	450	400+50
93	450	300+100+50
94	450	400+50
102	450	400+50
130	450	400+50
100	480	350+120
136	480	350+120
128	500	400
12	750	700+50
18	750	700+50
111	750	700+50



Obr. č. 22: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *AluI* v 2% agarózovém gelu. Označení (4-136) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 55, 136, 128 a 18).

Restrikční analýza pomocí enzymu *AluI* byla úspěšná u všech analyzovaných vzorků.

PCR produkt 410 bp je zastoupen pouze jediným vzorkem, který byl štěpen na tři fragmenty délky 280+80+50 bp.

Pomocí enzymu *AluI* byla početná skupina vzorků, o velikosti PCR produktu 450 bp, rozdělena na dvě skupiny s délkami fragmentů: 400+50 bp a 300+100+50 bp.

Amplifikované produkty 480 bp byly štěpeny na dva restrikční fragmenty délky 350+120 bp.

Jediný vzorek o velikosti PCR produktu 500 bp byl štěpen na restrikční fragment 400 bp. Vzorky o velikosti PCR produktu 750 bp byly rozštěpeny na dva restrikční fragmenty délky: 700+50 bp.

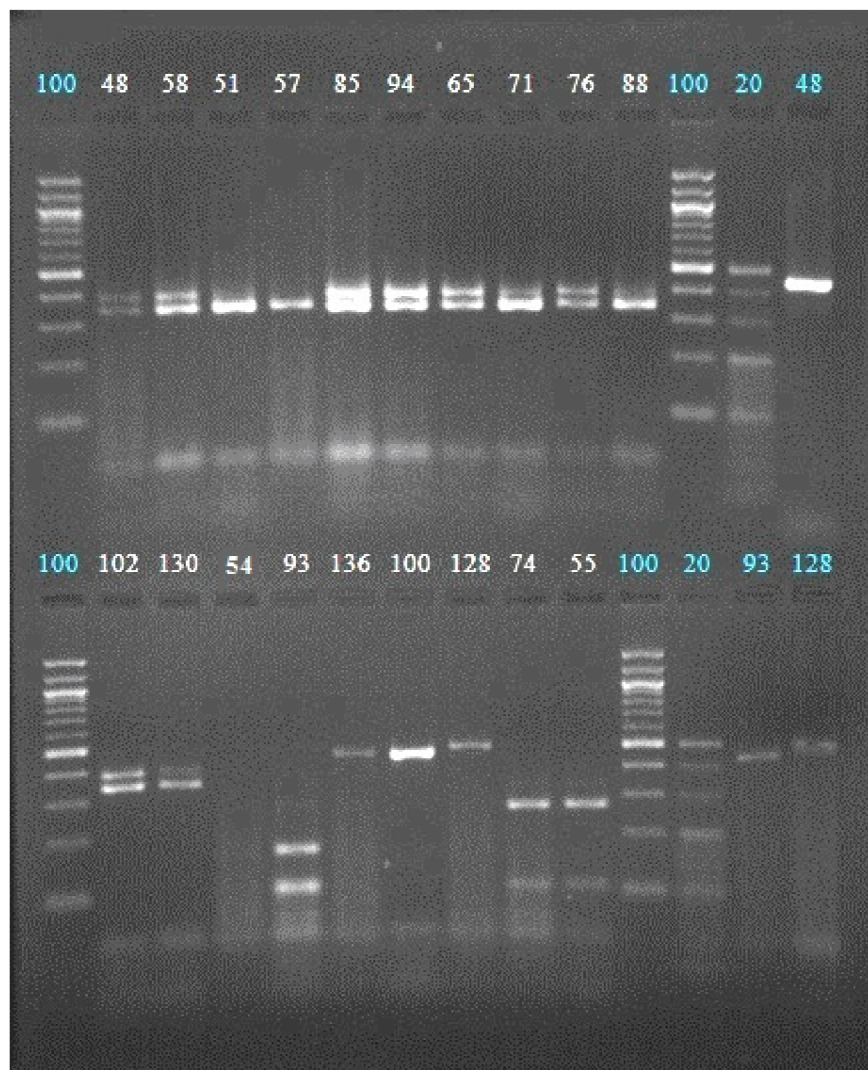
4.3.5 Analýza restrikční endonukleázou *MseI*

Jako poslední restrikční endonukleáza byl použit enzym *MseI*. Enzym štěpí DNA v místě 5'... T↓TTA ... 3'. Stejně jako v případě restrikční analýzy pomocí enzymu *AluI*, i enzym *MseI* byl použit k analýze menšího počtu vzorků. Z důvodů neúspěšného štěpení byla restrikční analýza u vzorku 54 provedena podruhé. Restrikční fragmenty získané tímto štěpením jsou uvedeny v tab. č. 13. Elektroforeogram štěpení PCR produktů je uveden na obr. č. 23.

Tab. č. 13: Souhrnná tabulka velikostí fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *MseI*. PO – pracovní označení vzorku, DP – délka PCR produktu, RF – velikost restrikčního fragmentu.

PO	DP (bp)	RF (bp)
4	410	270+90+50
48	450	350+390
51	450	350+390
54	450	180+100+60+50
55	450	280+100+50
57	450	350+390
58	450	350+390
65	450	350+390
71	450	350+390
74	450	280+100+50
76	450	350+390
85	450	350+390
88	450	350+390

PO	DP (bp)	RF (bp)
88	450	350+390
93	450	180+100+60+50
94	450	350+390
102	450	350+390
130	450	350+390
100	480	n
136	480	n
128	500	n
12	750	220+180+70+50
18	750	220+180+70+50
111	750	220+180+70+50



Obr. č. 23: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *MseI* v 2% agarózovém gelu. Označení (48-136) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 48, 93 a 128).

Štěpením PCR produktu o velikosti 410 bp byly získány tři fragmenty délky 270+90+50 bp.

Amplifikované produkty délky 450 bp byly štěpením rozděleny do tří skupin dle délek restričních fragmentů: 350+390 bp, 280+100+50 bp a 180+100+60+50 bp.

Z elektroforeogramu je patrné, že vzorky 100 a 136, které mají PCR produkt o velikosti 480 bp, nebyly pomocí enzymu *MseI* rozštěpeny, a je zřejmé, že neobsahují štěpné místo pro tento restriční enzym.

Jediný vzorek (pracovní označení 128), o velikosti PCR produktu 500 bp, neobsahuje štěpné místo pro enzym, a z elektroforeogramu je zřejmé, že původní PCR produkt byl zachován.

Štěpením PCR produktů o velikosti 750 bp byly získány čtyři restriční fragmenty délky: 220+180+70+50 bp.

4.4 Taxonomické zařazení identifikovaných kvasinek

Pro taxonomické zařazení jednotlivých vzorků kvasinek bylo použito srovnání restričních fragmentů typových kvasinek s výsledky restričních analýz shrnutých v předchozí kapitole 4.3.

Porovnáním délek a počtu restričních fragmentů, vzniklých po digesci různými restričními endonukleázami, byly jednotlivé kvasinky taxonomicky zařazeny.

Vzorky o velikosti PCR produktu 450 bp byly identifikovány a taxonomicky zařazeny na úrovni rodu. Restriční analýzou se podařilo rozdělit vzorky do pěti skupin. Následně bylo provedeno porovnání analyzovaných vzorků s typovými kvasinkami na základě délek restričních fragmentů. První skupina, která obsahuje vzorky s pracovním označením 47, 48, 49, 52, 58 a 61, byla identifikována jako rod *Pichia*. Skupiny vzorků (65, 83, 85, 86, 94, 107, 108) a (51, 57, 71, 76, 88, 102, 130) byly rovněž taxonomicky zařazeny mezi rod *Pichia*. Ačkoliv se tyto skupiny rodově shodují, z dendrogramů v kap. 4.5 je patrné, že se liší na úrovni druhu či kmene. Vzorky 55 a 74 se povedlo taxonomicky zařadit i na úrovni druhu. Vzorky byly identifikovány jako *Pichia kluyveri*. Vzorky s pracovním označením 50, 54, 56 a 93 byly identifikovány na úrovni druhu jako *Pichia membranifaciens*.

Skupina o velikost PCR produktu 500 bp byla zastoupena pouze jedním vzorkem, který byl taxonomicky zařazen jako *Issatchenkia orientalis*.

Z dendrogramů v kap. 4.5 je zřejmé, že vzorky o velikosti PCR produktu 750 bp nejsou naprosto totožné. V případě vzorků 12 a 18 bylo porovnáním výsledků analýzy reálných vzorků a vzorků typových kvasinek zjištěno, že se jedná o kvasinku *Hanseniaspora vineae*. Vzorek s pracovním označením 111 byl identifikován a taxonomicky zařazen pouze na úrovni rodu, jako rod *Hanseniaspora*.

Z důvodů chybějících typových kvasinek se vzorky o velikosti PCR produktu 410 bp a 480 bp nepodařilo identifikovat a taxonomicky zařadit.

V tab. č. 14 jsou shrnuty výsledky taxonomického zařazení jednotlivých vzorků.

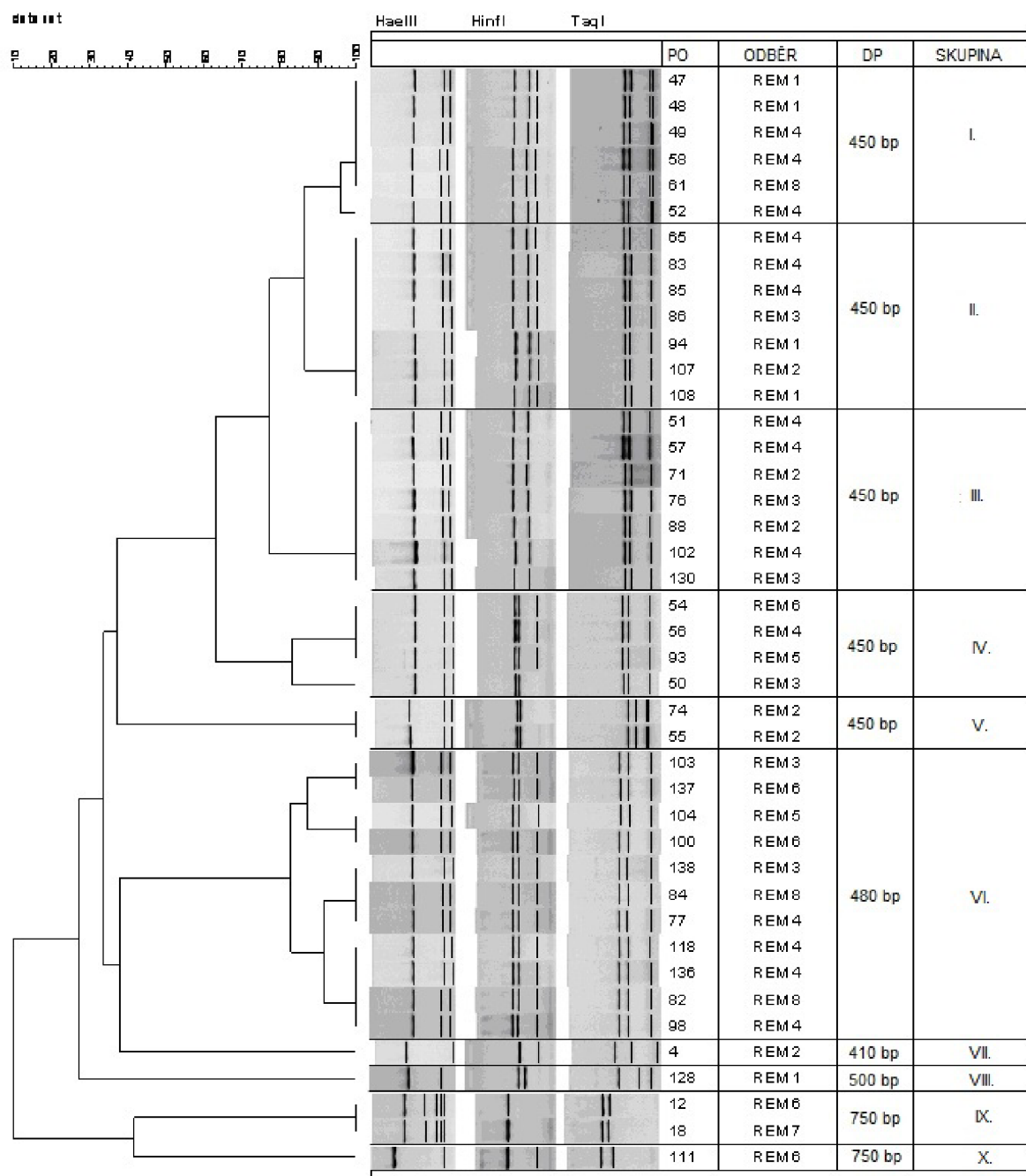
Tab. č. 14: Přehled taxonomického zařazení analyzovaných vzorků. PO – pracovní označení vzorku, DP – délka PCR produktu.

PO	DP (bp)	Taxonomické zařazení
4	410	Nezařazeno
47	450	<i>Pichia sp.</i>
48	450	
49	450	
52	450	
58	450	
61	450	
50	450	
54	450	
56	450	
93	450	
65	450	<i>Pichia sp.</i>
83	450	
85	450	
86	450	
94	450	
107	450	
108	450	
51	450	<i>Pichia sp.</i>
57	450	
71	450	
76	450	
88	450	
102	450	
130	450	

PO	DP (bp)	Taxonomické zařazení
55	450	<i>Pichia kluyveri</i>
74	450	
77	480	Nezařazeno
82	480	
84	480	
98	480	
100	480	
103	480	
104	480	
118	480	
136	480	
137	480	
138	480	
128	500	<i>Issatchenkia orientalis</i>
12	750	<i>Hanseniaspora vincae</i>
18	750	
111	750	<i>Hanseniaspora sp.</i>

4.5 Dendrogramy identifikovaných kvasinek

K prokázání genetické podobnosti kvasinek byl použit počítačový program BioNumerics. Vyhodnocení bylo provedeno na základě UPGMA klastrové analýzy s Jaccardovými koeficienty podobnosti s tolerancí 5% a výsledkem této analýzy jsou dendrogramy, které rozdělují vyizolované vzorky kvasinek do klastrů podle jejich genetické podobnosti.

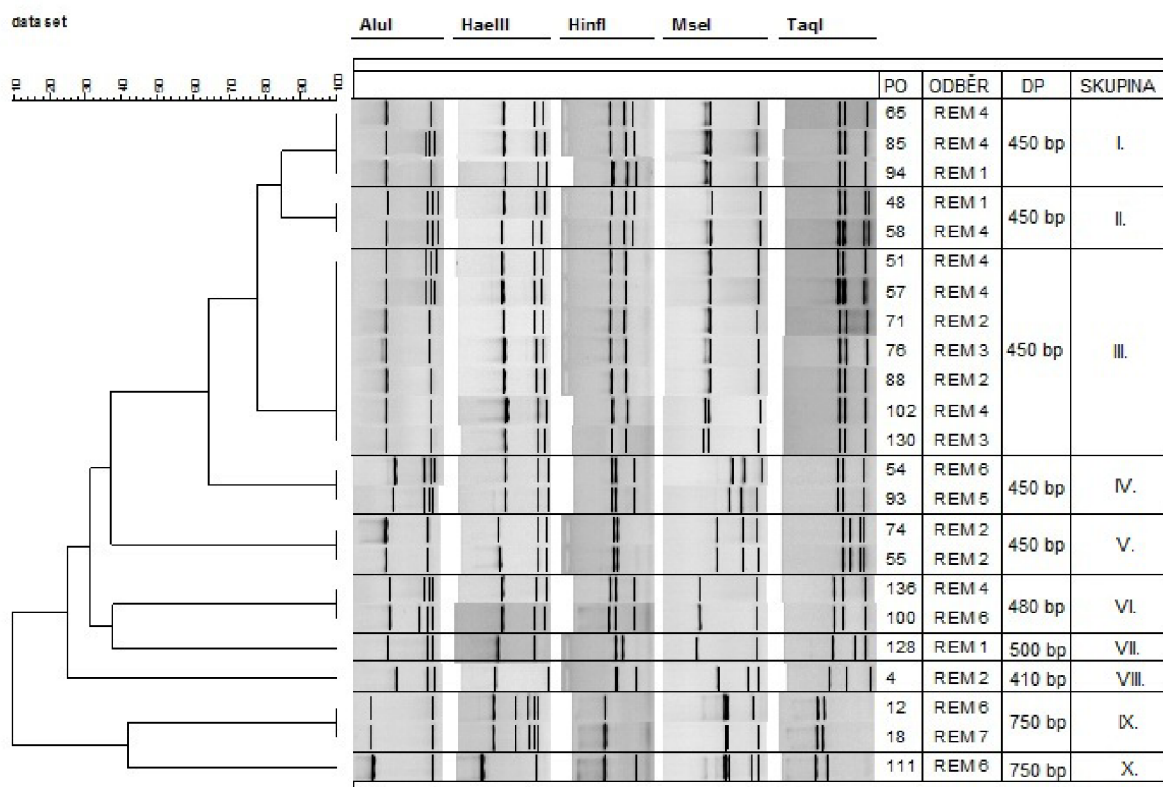


Obr. č. 24: Dendrogram genetické podobnosti kvasinek izolovaných z vína, sestavený na základě výsledků RFLP – pro enzymy *HaeIII*, *HinfI* a *TaqI*. PO – pracovní označení vzorku, DP - délka PCR produktu

Dendrogram, vytvořený z výsledků restrikčních analýz pomocí endonukleáz *HaeIII*, *HinfI* a *TaqI*, rozdělil vzorky vyizolovaných kvasinek do 10-ti skupin. K ověření správnosti

rozdělení a pro přesnější identifikaci a taxonomické zařazení kvasinek byla provedena restriční analýza s enzymy *AluI* a *MseI*. Z hlediska časové náročnosti experimentu byl k ověření správnosti zredukován počet vzorků. Analyzované vzorky byly vybrány z jednotlivých skupin, u kterých byla prokázána 100% genetická podobnost.

Můžeme říci, že v rámci každé skupiny jsou kvasinky, jejichž genetická podobnost je na úrovni 100 %, totožné. Kvasinky zařazené do skupin I., II., III. s délkou PCR produktu 450 bp byly podle typových kvasinek zařazené rodově jako *Pichia sp.* Skupina IV. byla taxonomicky zařazena na úrovni druhu jako *Pichia membranifaciens* a skupina V. byla zařazena na úrovni druhu jako *Pichia kluyveri*. Nezařazené zůstávají kvasinky, které podle klastrové analýzy byly zařazené do skupin VI. a VII. Na dendrogramu je možné vidět, že v rámci skupiny VI. jsou čtyři podskupiny kvasinek s genetickou podobností na úrovni 100 %, tzn. že jsme v této skupině identifikovali čtyři různé kvasinky. Kvasinka s pracovním označením 128 (zařazena jako samostatná skupina VIII.) byla identifikována jako *Issatchenkia orientalis*. Kvasinky skupiny IX. a X. s délkou PCR produktu 750 bp byly zařazené do rodu *Hanseniaspora*. Na úrovni druhu jako *Hanseniaspora vinæ* byly identifikovány vzorky s pracovním označením 12 a 18. Vzorek s pracovním označením 111 byl určen pouze na úrovni rodu.



Obr. č. 25: Dendrogram genetické podobnosti vybraných kvasinek izolovaných z vína, sestavený na základě výsledků RFLP – pro enzymy *HaeIII*, *HinfI*, *TaqI*, *AluI* a *MseI*.
PO – pracovní označení vzorku, DP - délka PCR produktu

Dendrogram, sestavený z výsledků restričních analýz pomocí všech pěti restričních endonukleáz, nám potvrdil rozdělení vzorků do 10-ti skupin a taxonomické zařazení. V případě nezařazených vzorků nemáme v naší databázi odpovídající typové kvasinky.

5 ZÁVĚR

V teoretické části diplomové práce byla shrnuta morfologie, cytologie kvasinek, také způsob jejich rozmnožování. Byl zde popsán technologický proces výroby červeného vína a základní informace o ekologickém způsobu pěstování vinné révy. Dále se v teoretické části nachází podrobný popis průběhu amplifikace DNA *in vitro* pomocí polymerázové řetězové reakce. Součástí je i teoretický základ metod založených na analýze DNA, např. PCR–RFLP, DNA–fingerprinting a elektroforetická detekce DNA fragmentů.

V experimentální části byla využita metoda PCR-RFLP k identifikaci a taxonomickému zařazení vinných kvasinek.

K analýzám byla použita DNA kvasinek izolovaných z odrůdy Rulandské modré, které byly odebrány z mikulovské vinařské oblasti. Dodavatelem surovin bylo soukromé vinařství Holánek. Celkově bylo analyzováno 60 vyizolovaných vzorků kvasinek.

Na základě délky PCR produktu se kvasinky rozdělily do šesti skupin: 410 bp, 450 bp, 480 bp, 500 bp, 750 bp a 880 bp. Pro taxonomické zařazení byly provedeny restriční analýzy PCR produktů s restričními endonukleázami *Hae*III, *Hinf*I, *Taq*^I, *Alu*I a *Mse*I. Identifikace a taxonomické zařazení byly provedeny srovnáním získaných fragmentů s typovými kvasinkami a také po vyhodnocení všech vzorků kvasinek programem BioNumerics. Na základě výsledků můžeme konstatovat, že vzorky kvasinek byly identifikovány a taxonomicky zařazeny následně:

- Velikost PCR produktu 410 bp → nezařazeno
- Velikost PCR produktu 450 bp → *Pichia sp.* (druhovému zařazení vzorků 55, 74 jako *Pichia kluyveri*, druhové zařazení vzorků 50, 54, 56, 93 jako *Pichia membranifaciens*)
- Velikost PCR produktu 480 bp → nezařazeno
- Velikost PCR produktu 500 bp → *Issatchenkia orientalis*
- Velikost PCR produktu 750 bp → *Hanseniaspora sp.* (druhovému zařazení vzorků 12, 18 jako *Hanseniaspora vineae*)

Za pomoci programu BioNumerics byla provedena analýza genetické podobnosti jednotlivých vzorků kvasinek. Výsledkem této analýzy jsou dendrogramy, rozdělující vzorky kvasinek do 10-ti skupin, které korespondují s délkou PCR produktu a s taxonomickým zařazením.

Závěrem je možné konstatovat, že pro plnou identifikaci všech izolovaných kvasinek je nezbytně nutné provést další analýzy typových kvasinek, které nám pomohou k přesnější identifikaci. To bude předmětem dalších diplomových prací.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha : ACADEMIA, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] JANDEROVÁ, B.; BENDO VÁ, O.: *Úvod do biologie kvasinek*. Praha : Karolinum, 1999. 108 s. ISBN 80-7184-990-1.
- [3] HUDECOVÁ, D.; MAJTÁN, V.: *Mikrobiológia I*. 1.vyd. Bratislava : STU, 2002. 189 s. ISBN 80-227-1663-4.
- [4] ADAMS, M.R.; MOOS, M.O.: *Food Microbiology*. 2nd Ed. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2000. 479 s. ISBN 0-85404-611-9.
- [5] VAJCIKOVÁ, I.; BREIEROVÁ, E.: *Identifikácia a druhové zastúpenie kvasiniek pri fermentácii hroznového muštu* [online]. Bratislava : [s.n.], [2000] [cit. 2010-10-30]. Dostupné z WWW: <http://ns.ucm.sk/FPV/dokumenty/nb/nb_iii-2_2003/13_Vajcikova.pdf>.
- [6] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1.vyd. Bratislava : ALFA, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [7] BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.: *Yeasts in food : beneficial and detrimental aspects*. Cambridge : Boca Raton : Woodhead Publishing Limited ; CRC Press, 2003. 488 s. ISBN 1-85573-706-X.
- [8] FELDMANN, H.: *Yeast Molecular Biology* [online]. University of Munich : Adolf-Butenandt-Institute, 2005 [cit. 2010-10-31]. Dostupné z WWW: <http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/>.
- [9] ŠIPIČKÝ, M.: *Genetika kvasiniek*. 1.vyd. Bratislava : Veda, 1992. 315 s. ISBN 80-224-0396-2.
- [10] LOSKOTOVÁ, M.: *Využití kvasinkovitých mikroorganizmů v moderních biotechnologiích* [online]. Brno : Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2005 [cit. 2010-10-30]. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/spustit.html>>
- [11] PTÁČEK, V.: *CYTOLOGIE – NAUKA O BUŇKÁCH* [online]. Brno : 2007 [cit. 2010-11-03]. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/ptacek/CYTOLOGIE6.htm>>.
- [12] KOCKOVÁ, A.: *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982. 483 s.
- [13] LEA, A.G.H.; PIGGOTT, J.R.: *Fermented Beverage Production*. London : Blackie Academic and Professional, 2000. 428 s. ISBN 0-7514-0027-0.
- [14] ALBERTS, B.: *Základy buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem : Espero, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4.
- [15] MCKEE, T.; MCKEE, J.R.: *Biochemistry*. Dubuque : Wm. C. Brown Publishers, 1996. 638 s. ISBN 0-697-21159-2.
- [16] PELIKÁN, M.; DUDÁŠ, F.; MÍŠA, D.: *Technologie kvasného průmyslu*. 1. vyd. Brno: MZLU, 1996. 129 s. ISBN 80-715-7240-3.
- [17] QUEROL, A., et al.: *Adaptive evolution of wine yeast*. International Journal of Food Microbiology. 2003, no.86, s. 3-10.
- [18] JOSEPA, S.; GUILLAMON, J.M.; CANO, J.: *PCR differentiation of Saccharomyces cerevisiae from Saccharomyces bayanus/Saccharomyces pastorianus using specific primers*. FEMS Microbiology Letters. 2000, vol. 193, s. 255-259.

- [19] DE MELO PEREIRA, G.V., et al.: *Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of Saccharomyces genus: Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces bayanus and Saccharomyces pastorianus*. The Society for Applied Microbiology : Letters in Applied Microbiology. 2010, no.51, s. 131-137.
- [20] CHUMCHALOVÁ, J., et al.: *MINIATLAS MIKROORGANISMŮ* [online]. 2006 [cit. 2011-02-26]. Dostupné z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/mikr.htm>>.
- [21] KLABAN, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1.vyd. Praha : Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [22] MASNEUF-POMARÈDE, I., et al.: *Molecular typing of wine yeast strains Saccharomyces bayanus var. uvarum using microsatellite markers*. Systematic and Applied Microbiology. 2007, vol. 30, no. 1, s. 75-82.
- [23] GÖRNER, F.; VALÍK, E.: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin : princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [24] CADEZ, N.; SMITH, M.T.: *The Yeasts*. 5th. edition.: Elsevier, 2011. Chapter 32 - Hanseniaspora Zikes (1912) , s. 421-434. ISBN 978-0-444-52149-1.
- [25] MINÁRIK, E.; NAVARA, A.: *Chémia a mikrobiológia vína*. 1.vyd. Bratislava : Priroda, 1986. 547 s.
- [26] FUGELSANG, K.C.; EDWARDS, Ch.G.: *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd ed. New York : Springer, 2007. 393 s. ISBN 0-387-33341-x.
- [27] FRANK, H.K.: *Dictionary of Food Microbiology*. Lancaster : Technomic Publishing CO., INC., 1992. 298 s. ISBN 15-667-6010-0.
- [28] LACHANCE, M.A.: *The Yeasts*. 5th. Edition.: Elsevier, 2011. Chapter 46 - Metschnikowia Kamienski (1899) , s. 575-620. ISBN 978-0-444-52149-1.
- [29] KADLEC, P.; FIALA, J.: *Co byste měli vědět o výrobě potravin? : technologie potravin /*. 1.vyd. Ostrava : Key Publishing, 2009. 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [30] Česká republika. *Vyhláška, kterou se stanoví seznam vinařských podoblastí, vinařských obcí a viničních tratí*. SBÍRKA PŘEDPISŮ ČESKÉ REPUBLIKY. 2010, částka 92, s. 3586-3614. Dostupný také z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1005997&doctype=ART>>.
- [31] ČEPIČKA, J.: *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha : VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN 80-708-0239-1.
- [32] TORIJA, M.J., et al.: *Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years.*, Antonie van Leeuwenhoek, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 2001: s. 345-352.
- [33] ROMANO, P., et al.: *Function of yeast species and strains in wine flavour*. International Journal of Food Microbiology. 2003, vol.86, no.1-2, s. 169-180.
- [34] PHISTER, T.G.; RAWSTHORNE, H.; JOSEPH, C.M.L.: *Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of Hanseniaspora Species from Wine and Juice*. American Society for Enology and Viticulture. 2007, vol.58; no. 2, s. 229-233.
- [35] MALÍK, F.: *Ze života vína*. Pardubice : Filip Trend Publishing, 2003. 221 s. ISBN 80-86282-27-9.

- [36] ŠEVČÍK, L.: *Červená vína : hledání pravdy o víně*. 1.vyd. Praha : Grada, 1999. 139 s. ISBN 80-7169-840-7.
- [37] KRAUS, V.: *Réva a víno v Čechách a na Moravě*. 1.vyd. Praha : Radix, 1999. 280 s. ISBN 80-86031-23-3.
- [38] *Znovín Znojmo* [online]. 2011 [cit. 2011-03-08]. Rulandské modré. Dostupné z WWW: <<http://www.znovin.cz/Article.asp?nArticleID=14&nLanguageID=1>>.
- [39] PAVLOUŠEK, P.: *Encyklopedie révy vinné*. 2.aktualiz.vyd. Brno : Computer Press, 2008. 316 s. ISBN 978-80-251-2263-1.
- [40] FARKAŠ, J.: *Technologie a biochemie vína*. 2.přeprac. a dopl. vyd. Praha : SNTL-Nakladatelství technické literatury, 1980. 870 s.
- [41] FLEET, G.H.: *Yeast interactions and wine flavour*. International Journal of Food Microbiology. 2003, no.86, s. 11-22.
- [42] OTÁHAL, K.: *Jak z hroznů víno dělat*. Praha : Jonathan Livingston, 2010. 99 s. ISBN 978-80-86037-35-6.
- [43] KRAUS, V.; HUBÁČEK, V.; ACKERMANN, P.: *Rukověť vinaře*. 3.vyd. Praha : Brázda, 2010. 267 s. ISBN 978-80-209-0378-5.
- [44] STEIDL, R.; RENNER, W.; SEDLO, J.: *Moderní příprava červeného vína*. 2., upr. vyd. Valtice : Národní vinařské centrum, 2006. 72 s. ISBN 80-903201-7-1.
- [45] KUTTELVAŠER, Z.: *Abeceda vína*. Vyd. 2. Praha : Radix, 2003. 279 s. ISBN 80-860-3143-8.
- [46] DI MARO, E.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S.: *Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanésca grape*. International Journal of Food Microbiology. 2007, no.117, s. 201-210.
- [47] SIMON, J.: *O víně*. 1.vyd. Praha : Slovart, 2002. 224 s. ISBN 80-7209-386-X.
- [48] BAIEROVÁ, L.; ČECHOVÁ, R.: *EnviWeb* [online]. 2010 [cit. 2011-03-23]. Zakázané biovíno. Dostupné z WWW: <<http://www.enviweb.cz/clanek/zemedelstvi/83648/zakazane-biovino>>.
- [49] *EKOVIN* [online]. 2010 [cit. 2011-03-21]. Svaz integrované a ekologické produkce hroznů a vína. Dostupné z WWW: <<http://www.ekovin.cz/sekce-ekologicke-produkce>>.
- [50] SNUSTAD, D.P., et al.: *Genetika*. 1.vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2009. 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [51] MURRAY, R.K.: *Harperova Biochemie*. 4.vyd. Jinočany : H & H, 2002. 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [52] BROWN, T.A.: *Klonování genů a analýza DNA*. 1.české vyd. Olomouc : Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [53] ŠMARDA, J., et al.: *Metody molekulární biologie*. 1.vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [54] KRÁLOVÁ, B., et al.: *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. 254 s. ISBN 80-7080-449-1.
- [55] RUML, T.; RUMLOVÁ, M.; PAČES, V.: *Genové inženýrství*. 1.vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [56] *Rapid Detection Assays for Food and Water*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 2001. 243 s. ISBN 08-540-4779.
- [57] STEFFEN, C.: *PCR Applications Manual*: Roche Molecular Biochemicals, Mannheim: Roche Diagnostics GmbH, 1999.

- [58] SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.: *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd. ed. New York : Cold spring harbor laboratory press, 2001. 3 sv. ISBN 978-087-9695-774.
- [59] BERMINGHAM, N.; LUETTICH, K.: *Polymerase chain reaction and its applications*. Current Diagnostic Pathology. 2003, no.9, s. 159-164.
- [60] ARROYO-LÓPEZ, F.N.; QUEROL, A.; BAUTISTA-GALLEGO, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.: *Role of yeasts in table olive production*. International Journal of Food Microbiology. 2008, vol.128, n.3, s. 189-196.
- [61] VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J.D.; VAN EIJK, M.J.T.: *AFLP technology for DNA fingerprinting*. Nature Protocols. 2007, vol.2, no.6, s. 1387-1398.
- [62] KARATAŞ, H.; AĞAOĞLU, Y.S.: *RAPD analysis of selected local Turkish grape cultivars (Vitis vinifera)*. Genetics and Molecular Research. 2010, vol.9, no.4, s. 1980-1986.
- [63] CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P.: *Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-Saccharomyces wine species*. International Journal of Food Microbiology. 2003, n.84, s. 33-39.
- [64] PRŮŠA, R.: *Multimediální učebnice DNA diagnostiky* [online]. 1.vyd. Praha : 2. lékařská fakulta UK, 1998 [cit. 2011-03-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/newlook/defa3.htm>>.
- [65] FERNÁNDEZ, M.T.; UBEDA, J.F.; BRIONES, A.I.: *Comparative study of non-Saccharomyces microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods*. FEMS Microbiology Letters. 1999, n.173, s. 223-229.
- [66] *Roche Applied Science* [online]. 2008 [cit. 2011-04-06]. Restriction Enzymes FAQs and Ordering Guide. Dostupné z WWW: <http://www.roche-applied-science.com/ots/pdf/re_manual_08_04.pdf>.
- [67] *New England Biolabs* [online]. 2009 [cit. 2011-04-06]. Dostupné z WWW: <<http://www.neb.com/nebecomm/products/category1.asp#2>>.
- [68] ŠURANSKÁ, H.: *Identifikace vinných kvasinek metodou PCR-RFLP*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 100 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- [69] KRÄTSCHMEROVÁ, K.: *Sledování populace vinných kvasinek během kvašení vinného moštu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 88 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

OBRÁZKY:

- [70] MILLOT, J.: *Earth History Timeline* [online]. Westfield State College: 2001 [cit.2010-11-06]. Dostupné z WWW: <<http://www.physci.wsc.ma.edu/young/hgeol/geoinfo/timeline/eukaryotes/eukaryotes.html>>.
- [71] GHANT, M.: *Biology* [online].Davidson College, 2010 [cit. 2011-03-01]. Molecular Biology. Dostupné z WWW: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2010/Ghant/Protein_Template.html>.
- [72] HÁJEK, M.: *Projekty SIPVZ* [online]. 2006 [cit. 2011-03-21]. Popis úpravy hroznů před vlastním lisováním. Dostupné z WWW: <<http://projektysipvz.gytool.cz/ProjektySIPVZ/Default.aspx?uid=586>>.

- [73] ČEŘOVSKÝ, J.: *Jižní svah* [online]. 2007 [cit. 2011-03-21]. Salon Vin 2006 / 2007 a tak okolo.... Dostupné z WWW: <<http://www.jizni-svah.cz/2007/09/salon-vn-2006-2007-tak-okolo.html>>.
- [74] GILBERT, S.F.: *NCBI* [online]. 2000 [cit. 2011-03-29]. Developmental Biology. Dostupné z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10051/figure/A581/?report=objectonly>>.
- [75] VAN HOLDE, M. *Ahern 3rd Edition* [online]. 2010 [cit. 2011-04-06]. Ahern 3rd Edition. Dostupné z WWW: <<http://met.fzu.edu.cn/cai/shenghua/resource/biochem/ch04/nucltide.htm>>.
- [76] DEÁK, T.: Handbook of Food Spoilage Yeasts. 2nd ed. CRC Press, 2007. 325 s. ISBN 1-4200-4493-1.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	adenosin-5'-trifosfát
NADH	nukleotidpolyfosfát
CO ₂	oxid uhličitý
°ČNM	základní jednotky pro český normalizovaný moštoměr
°KI	základní jednotky pro Klosterneuburský moštoměr
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů
RAPD	polymorfismus náhodně amplifikované DNA
AFLP	polymorfismus amplifikované délky fragmentů
bp	počet páru bází
kb	počet kilobází
UV	ultrafialové záření
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>M.</i>	<i>Metschnikowia</i>
A	adenin
T	thymin
G	guanin
C	cytosin
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dTTP	deoxythymintrifosfát
dGTP	deoxyguanintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
rRNA	ribosomální RNA
rDNA	ribosomální DNA
ITS	vnitřní prepisová oblast (z angl. internal transcribed spacer)
EtBr	ethidium bromid
n	neštěpeno
NK	negativní kontrola
PK	pozitivní kontrola
UPGMA	metoda párování pomocí nevážených aritmetických průměrů (z angl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Velikost amplifikované oblasti 5,8S-ITS rDNA jednotlivých vzorků kvasinek za použití primerů ITS1 a ITS4.

Příloha 2: Elektroforeogramy PCR produktů vzorků, které byly amplifikovány primery ITS1 a ITS4.

Příloha 3: Souhrnná tabulka velikostí fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou *HaeIII*.

Příloha 4: Elektroforeogramy štěpení PCR produktů vzorků enzymem *HaeIII* v 2% agarózovém gelu.

Příloha 5: Elektroforeogramy štěpení PCR produktů vzorků enzymem *HinfI* v 2% agarózovém gelu.

Příloha 6: Elektroforeogramy štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Taq^αI* v 2% agarózovém gelu.

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Velikost amplifikované oblasti 5,8S-ITS rDNA jednotlivých vzorků kvasinek za použití primerů ITS1 a ITS4.

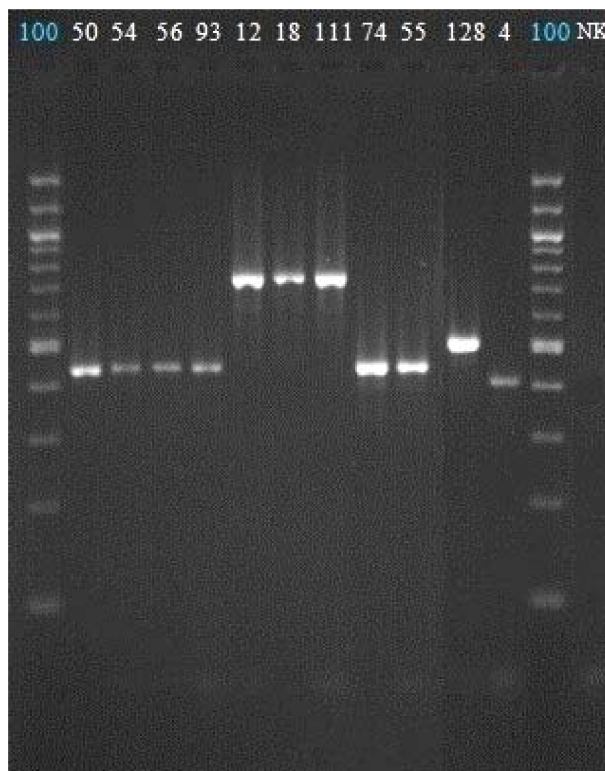
Tab. č. 1: Velikost amplifikované oblasti 5,8S-ITS rDNA jednotlivých vzorků kvasinek za použití primerů ITS1 a ITS4. PO – pracovní označení, DP – délka PCR produktu.

Odběr	Den	PO	DP (bp)
REM 1	1.	47	450
REM 1	1.	48	450
REM 1	1.	94	450
REM 1	1.	108	450
REM 1	1.	128	500
REM 2	3.	55	450
REM 2	3.	71	450
REM 2	3.	74	450
REM 2	3.	88	450
REM 2	3.	107	450
REM 2	3.	4	410
REM 3	5.	50	450
REM 3	5.	76	450
REM 3	5.	86	450
REM 3	5.	103	480
REM 3	5.	130	450
REM 3	5.	138	480
REM 4	8.	49	450
REM 4	8.	51	450
REM 4	8.	52	450
REM 4	8.	56	450
REM 4	8.	57	450
REM 4	8.	58	450
REM 4	8.	65	450
REM 4	8.	77	480
REM 4	8.	83	450
REM 4	8.	85	450
REM 4	8.	98	480
REM 4	8.	102	450

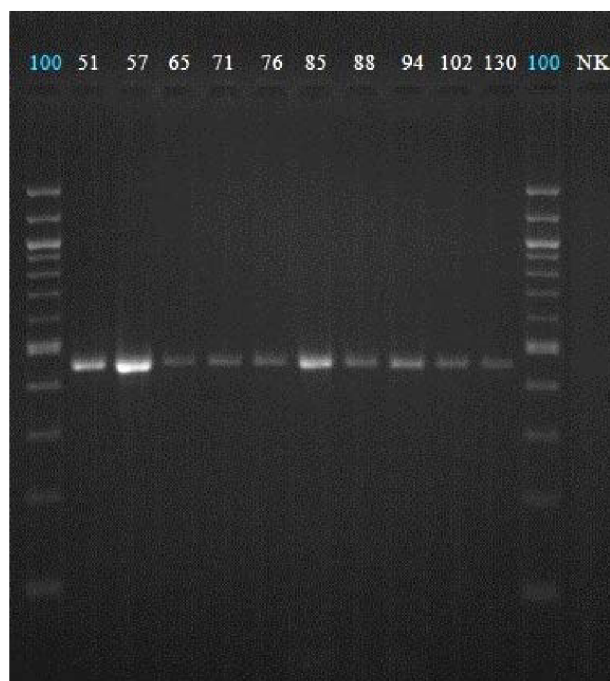
Tab. č. 1: Pokračování.

Odběr	Den	PO	DP (bp)
REM 4	8.	118	480
REM 4	8.	136	480
REM 4	8.	2	880
REM 4	8.	13	880
REM 5	10.	93	450
REM 5	10.	104	480
REM 5	10.	3	880
REM 5	10.	8	880
REM 5	10.	10	880
REM 5	10.	5	880
REM 6	12.	54	450
REM 6	12.	100	480
REM 6	12.	111	750
REM 6	12.	119	880
REM 6	12.	137	480
REM 6	12.	1	880
REM 6	12.	11	880
REM 6	12.	12	750
REM 6	12.	14	880
REM 7	15.	41	880
REM 7	15.	42	880
REM 7	15.	6	880
REM 7	15.	7	880
REM 7	15.	16	880
REM 7	15.	17	880
REM 7	15.	18	750
REM 8	19.	61	450
REM 8	19.	82	480
REM 8	19.	84	480
REM 8	19.	9	880
REM 8	19.	15	880

Příloha 2: Elektroforeogramy PCR produktu vzorků, které byly amplifikovány primery ITS1 a ITS4.



Obr. č. 1: Elektroforeogram PCR produktu vzorků, o velikosti fragmentů 410, 450, 500 a 750 bp, které byly amplifikovány primery ITS1 a ITS4. Označení (4-128) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, NK – negativní kontrola..



Obr. č. 2: Elektroforeogram PCR produktu vzorků, o velikosti fragmentů 410, 450, 500 a 750 bp, které byly amplifikovány primery ITS1 a ITS4. Označení (51-130) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, NK – negativní kontrola.



Obr. č. 3: *Elektroforeogram PCR produktu vzorků, o velikosti fragmentů 480 bp, které byly amplifikovány primery ITS1 a ITS4. Označení (77-138) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, NK – negativní kontrola.*

Příloha 3: Souhrnná tabulka velikostí fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *Hae*III.

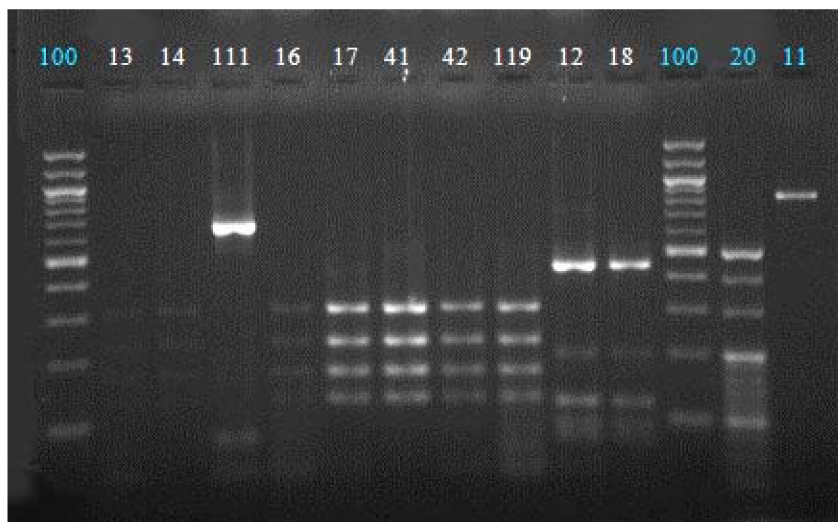
Tab. č. 2: Souhrnná tabulka velikostí fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou HaeIII. PO – pracovní označení vzorku, DP – délka PCR produktu, RF – velikost restrikčního fragmentu.

PO	DP (bp)	RF (bp)
4	410	n
47	450	300+80+50
48	450	300+80+50
49	450	300+80+50
50	450	300+80+50
51	450	320+80+50
52	450	300+80+50
54	450	300+80+50
55	450	380+80
56	450	300+80+50
57	450	300+80+50
58	450	300+80+50
61	450	300+80+50
65	450	300+80+50
71	450	300+80+50
74	450	380+80
76	450	300+80+50
83	450	300+80+50
85	450	300+80+50
86	450	300+80+50
88	450	300+80+50
93	450	300+80+50
94	450	300+80+50
102	450	300+80+50
107	450	300+80+50
108	450	300+80+50
130	450	300+80+50
77	480	340+90+50
82	480	340+90+50
84	480	340+90+50
98	480	340+90+50
100	480	340+90+50
103	480	340+90+50
104	480	340+90+50
118	480	340+90+50
136	480	340+90+50

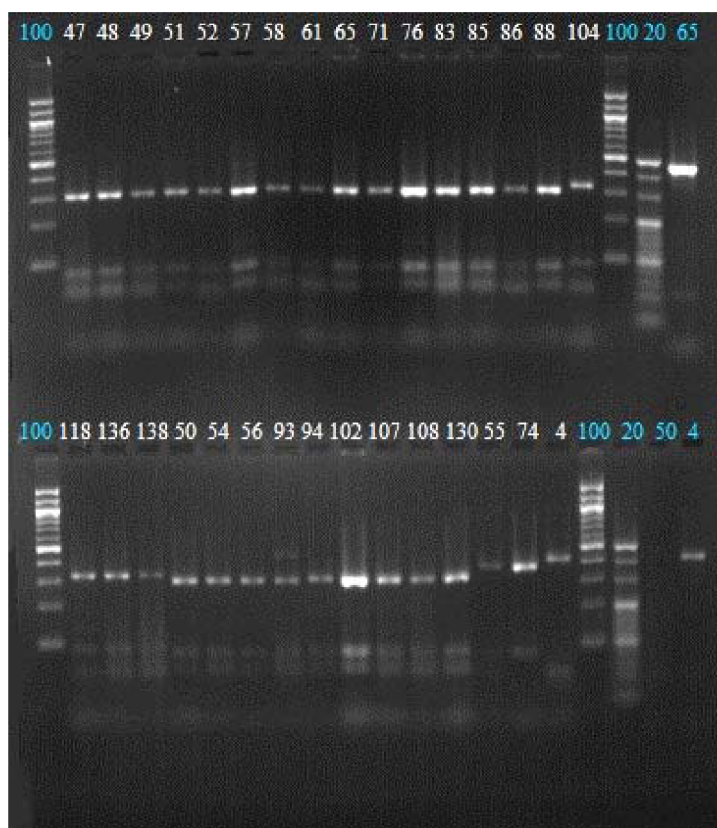
Tab. č. 2: Pokračování.

PO	DP (bp)	RF (bp)
137	480	340+90+50
138	480	340+90+50
128	500	390+100
12	750	450+200+120
18	750	450+200+120
111	750	620+90
1	880	310+240+170+130
2	880	310+240+170+130
3	880	310+240+170+130
5	880	310+240+170+130
6	880	310+240+170+130
7	880	310+240+170+130
8	880	310+240+170+130
9	880	310+240+170+130
10	880	310+240+170+130
11	880	310+240+170+130
13	880	310+240+170+130
14	880	310+240+170+130
15	880	310+240+170+130
16	880	310+240+170+130
17	880	310+240+170+130
41	880	310+240+170+130
42	880	310+240+170+130
119	880	310+240+170+130

Příloha 4: Elektroforeogramy štěpení PCR produktů vzorků enzymem *HaeIII* v 2% agarózovém gelu.



Obr. č. 4: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *HaeIII* v 2% agarózovém gelu. Označení (12-111) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorek 11).

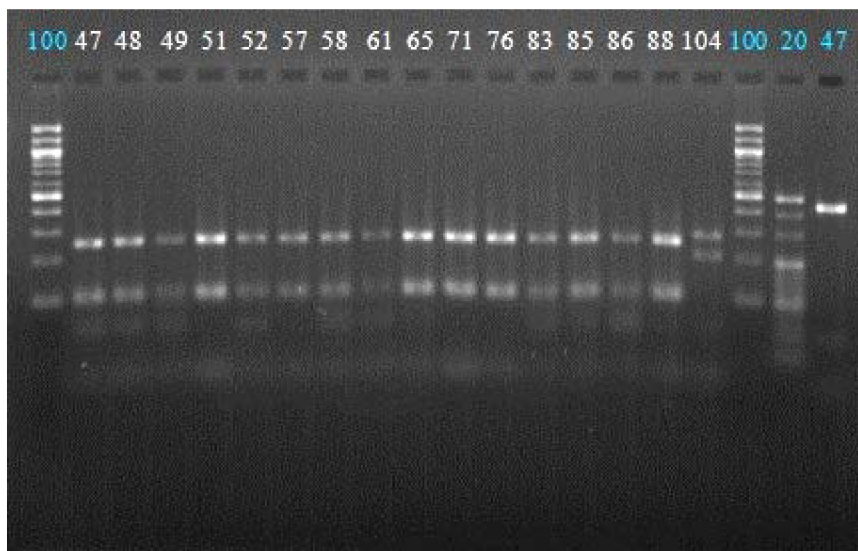


Obr. č. 5: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *HaeIII* v 2% agarózovém gelu. Označení (4-138) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 4, 50 a 65).

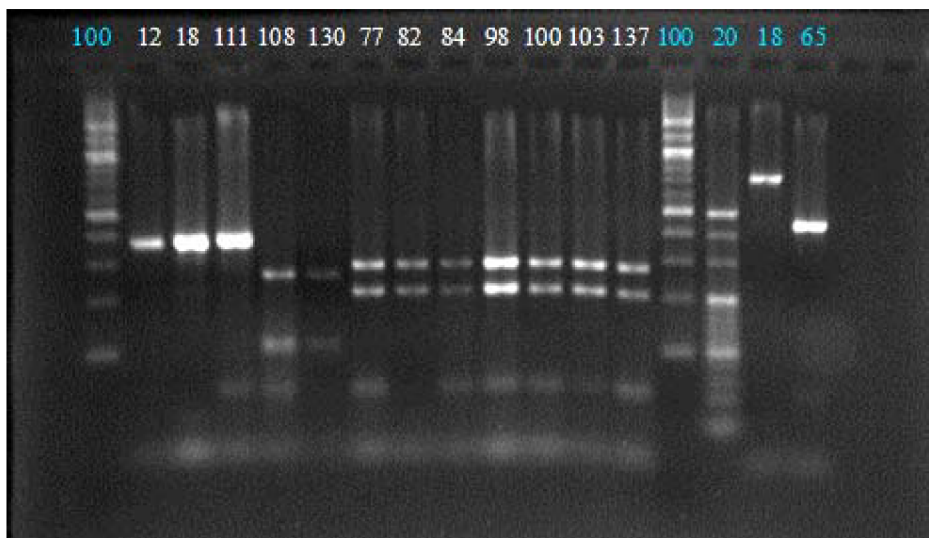


Obr. č. 6: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem HaeIII v 2% agarózovém gelu. Označení (77-128) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 82 a 128).

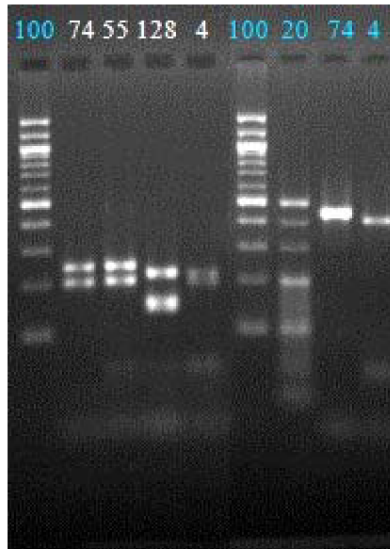
Příloha 5: Elektroforeogramy štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Hinf*I v 2% agarózovém gelu.



Obr. č. 7: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Hinf*I v 2% agarózovém gelu. Označení (47-104) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorek 47).

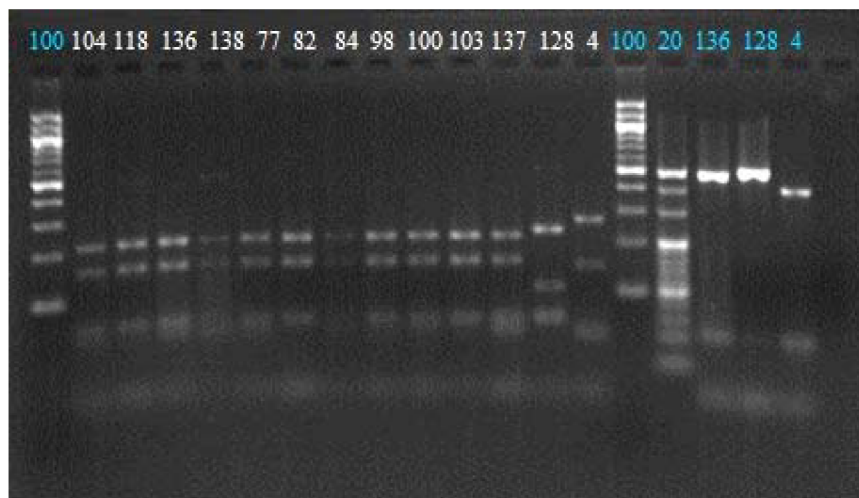


Obr. č. 8: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Hinf*I v 2% agarózovém gelu. Označení (12-137) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 18 a 65).

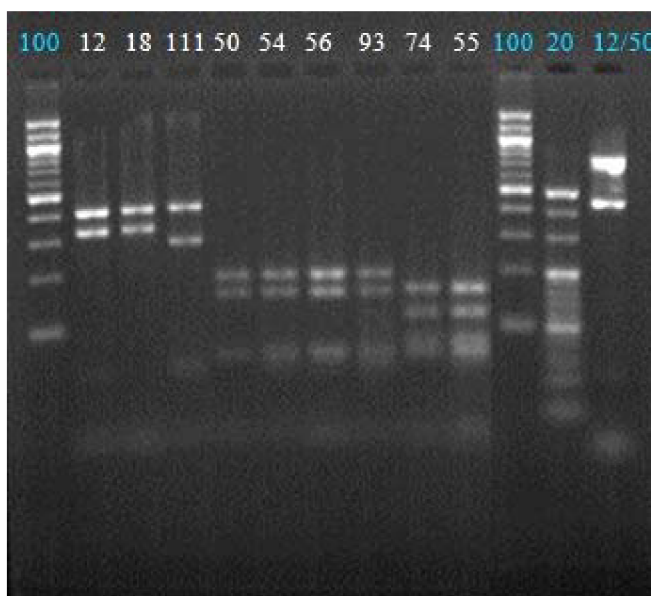


Obr. č. 9: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *HinfI* v 2% agarózovém gelu. Označení (4-128) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 4 a 74).

Příloha 6: Elektroforeogramy štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Taq^αI* v 2% agarózovém gelu.



Obr. č. 10: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Taq^αI* v 2% agarózovém gelu. Označení (4-138) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 4, 128 a 136).



Obr. č. 11: Elektroforeogram štěpení PCR produktů vzorků enzymem *Taq^αI* v 2% agarózovém gelu. Označení (12-111) – analyzované vzorky, 100 – délkový standard 100 bp, 20 – délkový standard – 20 bp, PK – pozitivní kontrola (vzorky 4, 128 a 136).