

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

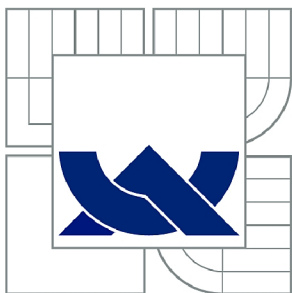
SLEDOVÁNÍ VLIVU POUŽITÍ AUTOCHTONNÍ KVASINKY PŘI VÝROBĚ
VÍNA V PODMÍNKÁCH VINAŘSTVÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

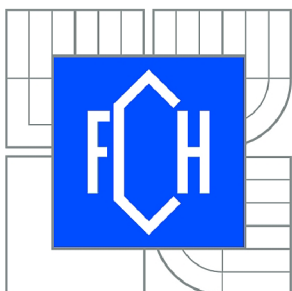
Bc. ROMANA BENÍČKOVÁ

BRNO 2014



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

SLEDOVÁNÍ VLIVU POUŽITÍ AUTOCHTONNÍ KVASINKY PŘI VÝROBĚ VÍNA V PODMÍNKÁCH VINAŘSTVÍ

MONITORING OF THE INFLUENCE OF USING INDIGENOUS YEASTS FOR WINE PRODUCTION
IN THE CONDITIONS OF WINERY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ROMANA BENÍČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0815/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Romana Beníčková**
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:

Sledování vlivu použití autochtonní kvasinky při výrobě vína v podmínkách vinařství

Zadání diplomové práce:

1. Výběr literatury a vypracování literární rešerše na dané téma
2. Výběr metod pro experimentální část a jejich aplikace
3. Zpracování výsledků experimentů a diskuse k získaným výsledkům

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Romana Beníčková
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá identifikací kvasinek metodou RFLP-PCR. Cílem práce bylo identifikovat kvasinky přítomné ve víně odrůdy Veltlínské zelené v průběhu kvašení. Identifikace byla provedena amplifikací 5,8S-ITS úseků DNA polymerázovou řetězovou reakcí pomocí primerů ITS1 a ITS4. Namnožená DNA byla podrobena restrikční analýze pomocí restrikčních endonukleáz *Hae*III, *Hinf*I a *Hha*I. Restrikční analýzou pomocí určitého enzymu dojde k našťipání amplifikovaného úseku DNA na specifické fragmenty charakteristické pro daný druh kvasinek. Ve studovaném víně bylo potvrzeno dominantní postavení autochtonní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v celém průběhu kvašení. Další identifikované kvasinky přítomné ve studovaném víně byly rodu *Pichia*.

Druhou částí diplomové práce bylo rozšířit používanou databázi o charakterizaci 28 typových kvasinek použitím RFLP-PCR analýzy. K posouzení genetické podobnosti byl využit program BioNumerics, který zpracoval výsledky UPGMA analýzou shluků s využitím Jaccardových koeficientů.

ABSTRACT

This thesis deals with identification of yeasts by applying the RFLP-PCR method. Objective of the thesis was to identify the yeasts present in wine from Grüner Veltliner during fermentation. Identification was made by amplification of 5,8S-ITS sequences of DNA by the polymerase chain reaction with primers ITS1 and ITS4. Amplified DNA was submitted to the restriction analysis by restriction endonuclease *Hae*III, *Hinf*I and *Hha*I. By restriction analysis with a specific enzyme, the amplified DNA is chopped into the specific fragments which are characteristic for given kind of yeasts. In the analysed wine, the dominance of autochthonal yeast *Saccharomyces cerevisiae* was confirmed throughout fermentation. The other identified yeasts in the wine were of kind *Pichia*.

The second part of the thesis was to expand the database by characterization of 28 type-yeasts, using RFLP-PCR analysis. To compare the genetic similarity, program BioNumerics was used, which processed the results of UPGMA cluster analysis using Jaccard's coefficients.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, identifikace, taxonomie, DNA, RFLP-PCR.

KEY WORDS

Yeasts, identification, taxonomy, DNA, RFLP-PCR.

BENÍČKOVÁ, R. Sledování vlivu použití autochtonní kvasinky při výrobě vína v podmínkách vinařství. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 66 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 na tomto místě poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Daně Vránové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala rodině za podporu v průběhu celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1	Víno a vinařství	12
2.1.1	Víno a jeho vliv na lidské zdraví	12
2.1.2	Réva vinná a její pěstování	12
2.1.3	Veltlínské zelené – vybraná odrůda pro studii	13
2.2	Vinné kvasinky	14
2.2.1	Vegetativní a pohlavní rozmnožování kvasinek	14
2.2.2	Morfologie kvasinek	15
2.2.3	Cytologie kvasinek	16
2.2.4	Taxonomie kvasinek	18
2.2.5	Nejvýznamnější rody kvasinek při výrobě vína	19
2.2.6	Autochtonní kvasinky	21
2.2.7	Metabolismus kvasinek	22
2.3	Identifikace kvasinek	25
2.3.1	Izolace DNA	26
2.3.2	Technika RFLP-PCR pro taxonomické zařazení kvasinek	26
2.3.3	Identifikace úseků DNA pomocí gelové elektroforézy	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie, přístroje a pomůcky	29
3.1.1	Mikroorganismy	29
3.1.2	Chemikálie	29
3.1.3	Přístroje a pomůcky	30
3.2	Kultivační média a použité roztoky	30
3.2.1	Příprava kultivačního média	30
3.2.2	Příprava kultivačního média s antibiotikem a kyselinou propionovou	30
3.2.3	Příprava ethidium bromidu	31
3.2.4	Příprava 10×TBE pufru	31
3.2.5	Příprava 1×TBE pufru	31
3.2.6	Příprava délkových standardů 100 bp a 20 bp	31
3.2.7	Příprava 2% agarózového gelu	31
3.2.8	Příprava octanového pufru	31
3.2.9	Příprava 80% ethanolu	32
3.2.10	Příprava PCR směsi	32
3.3	Pracovní postupy	32
3.3.1	Izolace čistých kultur kvasinek	32
3.3.2	Izolace DNA	32
3.3.3	PCR	33
3.3.4	Přečištění PCR produktu	34
3.3.5	Restrikční analýza	34

3.3.6	Elektroforetická detekce PCR produktů a restrikčních fragmentů.....	34
3.3.7	Zpracování výsledků v programu BioNumerics	35
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
4.1	Identifikace kvasinek izolovaných z vína	36
4.1.1	Kultivace kvasinkových kultur.....	36
4.1.2	Izolace DNA.....	36
4.1.3	Amplifikace izolované DNA pomocí PCR	37
4.1.4	Restrikční analýza (RFLP-PCR)	38
4.1.5	Dendrogram kvasinek izolovaných z vína	44
4.1.6	Senzorické hodnocení vína.....	46
4.2	Vyhodnocení výsledků typových kvasinek.....	47
4.2.1	Příprava vzorků typových kvasinek a izolace DNA	47
4.2.2	Amplifikace izolované DNA pomocí PCR	47
4.2.3	Restrikční analýza typových kvasinek (RFLP-PCR)	50
4.2.4	Dendrogram typových kvasinek.....	58
5	ZÁVĚR	60
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	65
8	PŘÍLOHY	66

1 ÚVOD

Víno, jako jeden z nejstarších alkoholických nápojů, je v potravinách řazeno mezi pochutiny, ale obsahuje i látky, které jsou ve výživě člověka považovány za nezbytné. Jsou to např. sacharidy, bílkoviny, mastné kyseliny, vitaminy a minerální látky [1]. Základem výroby vína je metabolická přeměna jednoduchých cukrů na ethanol zprostředkovaná vinnými kvasinkami, zejména rody *Saccharomyces*, *Pichia* nebo *Rhodotorula* [2]. Různorodá a dynamická činnost kvasinek je využívána v mnoha oblastech vědy, techniky i medicíny. Některé druhy kvasinek hrají významnou roli v produkci potravin, nápojů a farmaceutik, ale jiné mohou působit jako kontaminanty a negativně ovlivňovat lidské zdraví. Vzhledem k jejich velkému významu jsou předmětem studií už od 19. století [3].

K identifikaci kvasinek se běžně používají morfologické, fyziologické a biochemické testy, pomocí kterých dochází k charakterizaci jejich vlastností. Avšak v posledních letech dochází k útlumu studování buněčné fyziologie mikroorganismů a dochází naopak k velkému rozmachu genetiky a molekulární biologie [3]. Tyto techniky identifikace mikroorganismů jsou založeny na podobnostech či odlišnostech jejich DNA, RNA nebo proteinů. Jsou to zejména metody DNA-DNA hybridizace, dále metody PCR a její různé modifikace, sekvenování DNA aj. [4].

V práci byla pro identifikaci a taxonomické zařazení analyzovaných kvasinek využita technika RFLP-PCR, neboli stanovení polymorfizmu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR. Využívá se k typizaci cílové sekvence, která obsahuje sekvenční polymorfizmus. Touto metodou může být provedena analýza jakéhokoliv genu v závislosti na použitých primerech. Při analýze DNA kvasinek byly využity primery ITS1 a ITS4. Výsledkem polymerázové řetězové reakce jsou amplifikované produkty o stejné délce, které jsou poté štěpeny na specifické fragmenty pomocí restrikčních endonukleáz. Získané fragmenty se analyzují elektroforeticky a detekované délky fragmentů vzhledem k jejich specifičnosti slouží k taxonomickému zařazení analyzované kvasinky [4, 5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Víno a vinařství

Víno patří mezi nejstarší alkoholické nápoje a výrobu vína považujeme za jeden z nejstarších biotechnologických procesů. Mnohé archeologické nálezy dokládají, že výroba vína je stará již 7 až 10 tisíc let a za pravlast vína se považuje Gruzie a Arménie. Ve starověkém Egyptě v době 2500 let př. n. l. se už běžně pro zpracování vinných hroznů používal lis na hrozny. Ve starověkém Řecku a Římě se používaly na výrobu vína a jeho skladování nádoby, tzv. amfory, které se už tenkrát ošetřovaly před jejich naplněním sírou kvůli konzervačním schopnostem. Vinohradnictví a výroba vína se postupně rozšiřovaly do celého území Evropy díky římským výbojům. K rozšíření vinic na našem území došlo během 9. a 10. století v období Velkomoravské říše. K největšímu rozmachu vinohradnictví a vinařství v Čechách došlo za vlády Karla IV. [6, 7, 8].

2.1.1 Víno a jeho vliv na lidské zdraví

Víno je alkoholický nápoj vznikající přeměnou plodu révy vinné činností mikroorganismů. Jeho složení, vývoj, výživová hodnota a senzorické vlastnosti jsou dány širokou škálou biochemických procesů, růstových podmínek a technologických úprav. Definice vína podle hospodářské komise Evropské unie zní: „Víno je produktem vzniklým pouze alkoholovým kvašením, úplným nebo částečným, čerstvých hroznů, rozemletých či celých, nebo moštu získaného z hroznů.“ [9]

Účinky pití alkoholu jsou známé už od doby vzniku vinařství. V dnešní době je však již dokázáno, že nadměrná konzumace ethanolu a to jak příležitostná, tak i chronická, může mít neblahý dopad na tělesné i duševní zdraví. Výskyt volných radikálů v organismu způsobený příjmem vysokého množství alkoholu může způsobit cirhózu jater, zvyšuje pravděpodobnost hypertenze a mrtvice či napomáhá výskytu rakoviny prsu nebo trávicího traktu.

Na druhé straně mnohé výzkumy již dokázaly, že mírná konzumace vína v objemu 250 – 300 ml denně je spojena se snížením úmrtnosti oproti nadměrné konzumaci alkoholu, ale i abstinenci. U mírných konzumentů vína byl zjištěn nižší výskyt kardiovaskulárních onemocnění, snižuje se pravděpodobnost výskytu cukrovky 2. typu, některých druhů rakoviny a mnohých dalších nemocí [10].

2.1.2 Réva vinná a její pěstování

Réva vinná (*Vitis vinifera*) je liánovitá rostlina z čeledi révovitých, která dorůstá do výšky 10 až 30 m. Patří mezi teplomilné rostliny, u kterých životní děje nadzemní části keře probíhají při denní teplotě vyšší než 10°C. Její vegetační období je tedy v našich geografických podmínkách od jara do podzimu, kdy denní teplota pod 10°C obvykle neklesá. V květnu až v červnu kvete nenápadnými sladce vonícími bílými květy. Plody révy vinné jsou bobule, které dozrávají v průběhu září a října. V tomto období se také bobule sklízí a využívají se nejen na výrobu vína, ale také k přímé konzumaci a výrobě hroznových moštů a dalších nápojů.

Požadavky na polohu, půdu, svažitost pozemku či vláhu se liší podle odrůdy. Obecné zásady pro pěstování jsou však podobné. Obvykle by měl být pozemek chráněn před

chladnými větry, svažovat by se měl k jihu a také by měl mít dostatečný přísun slunečního záření. Ke kvalitnímu dozrání hroznů je potřeba teplý a suchý podzim. Optimální množství srážek pro pěstování révy vinné je 600 až 800 mm za rok. Silné vodní přívaly jsou nebezpečné pro příliš svažité pozemky, kde by mohlo docházet k erozi půdy. Půda by měla být dostatečně provzdušněná, vlhká, kyprá a bohatá na minerály. Omezujícím faktorem pro pěstování révy vinné je nadmořská výška. Obvykle lze révu pěstovat do 250 až 300 metrů nad mořem, tato hranice se však odvíjí i od zeměpisné polohy regionu [10, 11].

2.1.3 Veltlínské zelené – vybraná odrůda pro studii

Odrůda Veltlínské zelené neboli Grüner Veltliner má svůj původ s největší pravděpodobností v Dolním Rakousku, kde se stala nejrozšířenější odrůdou. Jedním z rodičů této odrůdy je nejspíš Tramín. Veltlínské zelené je převážně rozšířeno v zemích střední Evropy, a to hlavně v Rakousku, Maďarsku, bývalé Jugoslávii a na Slovensku. V České republice patří Veltlínské zelené mezi nejpěstovanější odrůdy. V roce 2004 představovala plocha pěstování této odrůdy 11 % z celkové plochy vinic v České republice, přestože se téměř výhradně pěstuje pouze ve vinařské oblasti Morava. Největší zastoupení má ve Znojemské vinařské podoblasti, dále na Mikulovsku, Mutěnicku, Velkopavlovicku a Podluží. Veltlínské zelené raší koncem měsíce dubna a kvete během začátku června. Zrání bobulí je vzhledem k jejich větší velikosti pozdní, dochází k němu koncem září až začátkem října. Kvůli pozdnímu dozrání vyžaduje tato odrůda výborné slunečné, vzdušné a teplé polohy pro pěstování. Tato odrůda je velmi plodná a poskytuje velké a pravidelné sklizně.

Veltlínské zelené má žlutozelenou barvu a využívá se pro výrobu jakostních vín a všech druhů vín přívlastkových a je také velmi vhodnou surovinou pro výrobu šumivých vín. Víno je aromatické, jako mladé voní svěžestí, pepřnatostí nebo lehkou vůní doutníku. Někdy se objevují tóny lipového květu, chřestu nebo mandlového aroma. Při zrání vína v lahvi se nejdříve zesilují kořenitě pepřnaté tóny a posléze vyniká mandlová chuť [8, 11].



Obrázek 1: Veltlínské zelené.

2.2 Vinné kvasinky

Kvasinky jsou obvykle jednobuněčné eukariotní mikroorganismy, které řadíme do rostlinného systému mezi vyšší houby. Jejich výskyt v přírodě je velmi široký, nachází se v půdě, ve vodě, v atmosféře, trávicím traktu lidí a zvířat, a vzhledem ke svým sacharolytickým schopnostem, především na substrátech obsahujících sacharidy. Kvasinky se rozmnožují vegetativně pučením nebo pohlavně spájením dvou haploidních buněk [12, 13].

Z hlediska nároku na kyslík řadíme většinu kvasinek mezi fakultativně anaerobní, přičemž tyto mikroorganismy rozdělujeme do dvou skupin. První skupinu tvoří tzv. fermentativní typy kvasinek, které i při aerobních podmínkách získávají energii převážně fermentací glukózy na ethanol. Druhou a větší skupinou jsou tzv. respirativní typy kvasinek, které převážně využívají energeticky výhodnější respiraci. Některé kvasinky řadíme mezi obligatorní aeroby. Jsou to kvasinky, které nemají alkoholdehydrogenázu, takže nefermentují a neprodukuje ethanol [14].

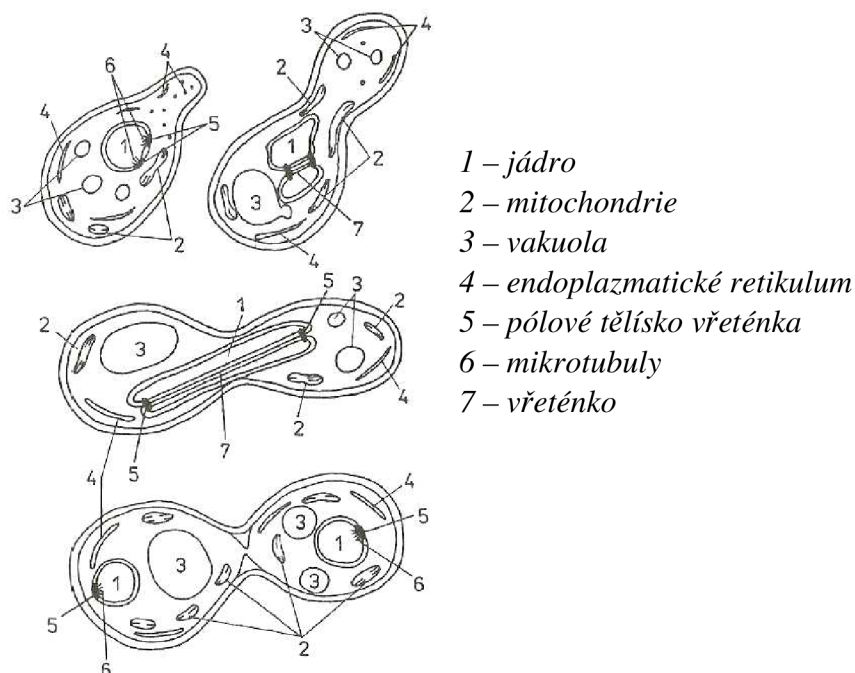
Většina kvasinek vyžaduje pro svoji existenci prostředí s vysokou vodní aktivitou. Pouze některé druhy patří mezi xenotolerantní, které rostou i v prostředí s nižší vodní aktivitou a se zvýšeným osmotickým tlakem [14].

Teplotní rozmezí pro růst kvasinek je přibližně od -2°C do 48°C . Většina vinných kvasinek patří mezi mezofilní, které rostou a množí se od 0°C do 48°C , přičemž v laboratorních podmínkách se běžně kultivují při teplotách od 25°C do 30°C . Kvasinky dokážou přežít při maximálních teplotách 57°C až 59°C [14].

2.2.1 Vegetativní a pohlavní rozmnožování kvasinek

Kvasinky se vegetativně rozmnožují dvěma způsoby, pučením nebo dělením buněk. Častějším způsobem vegetativního rozmnožování je pučení, kdy na mateřské buňce vyrůstá postupně se zvětšující pupen. Vznikající dceřinná buňka je s mateřskou propojena kanálkem, přes který prochází nové mitoticky rozdělené jádro a další buněčný materiál. Kanálek se poté cytoplazmatickou membránou uzavře a v pupenu se velmi intenzivně vytváří endoplazmatické retikulum. Pučení končí vytvořením buněčné stěny mezi mateřskou a dceřinnou buňkou, kdy většinou dochází k oddělení pupenu. Tento cyklus rozmnožování trvá za optimálních podmínek dvě hodiny. Podle místa vzniku pupenu dělíme pučení na monopolární, bipolární a multipolární. Při monopolárním pučení vznikají pupeny vždy na jednom pólu protáhlé buňky. U bipolárního pučení se střídá místo pučení na obou pólech kvasinkové buňky. Multipolárně pučící kvasinky vytváří pupeny po celém povrchu buňky, avšak na jednom místě pučí vždy pouze jednou. V místě oddělení pupenu od mateřské buňky vznikají tzv. jizvy. U multipolárně pučících kvasinek lze tedy podle počtu jizev zjistit, kolikrát pučení proběhlo.

Pokud při pučení na pólech nedojde k úplnému oddělení dceřinné buňky od mateřské, vzniká tzv. pseudomycelium. Příčinou tvorby pseudomycelia bývá často nedostatek živin v médiu. U některých kvasinek dochází k příčnému dělení protáhlých buněk za vzniku tzv. pravého mycelia. I tvorba pravého mycelia je podmíněna kultivačními podmínkami. Kvasinky tvořící pravé mycelium jsou schopny se za jiných podmínek rozmnožovat v jednobuněčné formě pučením [12, 13, 14].



Obrázek 2: Schéma pučení kvasinek [12].

U většiny kvasinek bylo kromě vegetativního rozmnožování sledováno i rozmnožování pohlavní. Obvykle dochází k pohlavnímu rozmnožování za nepříznivých podmínek v živném médiu, např. dojde k vyčerpání zkvasitelných cukrů, pH média je vysoké nebo je médium chudé na dusík. Základem pohlavního rozmnožování je spájení dvou haploidních buněk a jejich jader za vzniku jednoho diploidního jádra. Diploidní jádro se může dále vegetativně dělit mitózou, nebo dochází k jeho meiotickému dělení na 4 haploidní jádra. Haploidní jádra jsou buď základem pohlavních spor, nebo se mohou ještě opětovně dělit další mitózou a teprve potom z nich vznikají spory. V životním cyklu kvasinek probíhá pravidelné střídání haploidní a diploidní fáze buněk. Většina kvasinek tvoří spory ve formě askospor – endospor umístěných v asku neboli vřecku, takovéto kvasinky nazýváme Askomyceta. Některé kvasinky však tvoří pohlavní spory vně sporotvorných buněk – endospory a tyto rody řadíme mezi Basidiomyceta.

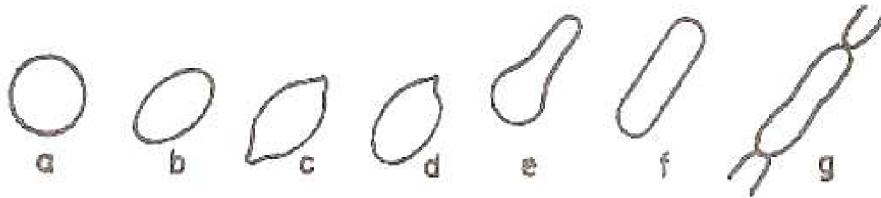
Hroznový mošt i víno jsou vhodným kultivačním médiem s dostatečným množstvím sacharidů i dalších živin pro růst a vegetativní rozmnožování vinných kvasinek, proto se zde pohlavní spory v zásadě nevyskytují [12, 15].

2.2.2 Morfologie kvasinek

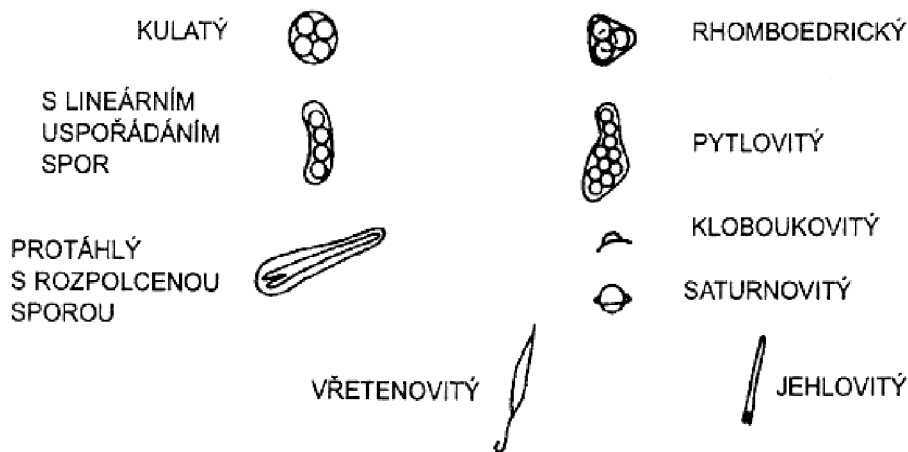
Kvasinkové buňky jsou velké 3 – 15 μm na rozdíl od buněk bakteriálních, které mají velikost od 0,5 – 1,5 μm . Tvar buněk je dán obvykle způsobem vegetativního rozmnožování – pučením nebo dělením, pohlavním rozmnožováním, výživovými podmínkami a stádiem životního cyklu. Kvasinky nabývají tvaru rotačního elipsoidu, který se mění na vejčitý až kulovitý nebo protáhlý. Někdy se však vyskytuje i tvar citronovitý, trojúhelníkovitý a válcovitý.

V souvislosti s pohlavním rozmnožováním rozlišujeme hlavně tvary haploidních spor nebo tvary celých vřecek. Spory bývají kulaté s hladkým nebo zvrásněným až bradavičnatým povrchem. Spory mohou být také opatřeny prstencem – saturnovitý tvar, nebo mohou mít kloboukovitý či vřetenovitý tvar. Nacházíme také spory, které jsou protáhlé a na konci

rozeklané. Vřecka nabývají kulatého tvaru nebo kopírují tvar, ve kterém jsou spory uloženy. Jsou to například vřecka rhomboedrická, protáhlá nebo pytlovitá. Tyto morfologické charakteristiky jsou důležitým faktorem při základní identifikaci kvasinek [12, 14].



Obrázek 3: Rozličné tvary buněk kvasinek: a – kulaté, b – oválné, elipsoidní, c – citronovité, d – ogivální, e – lahvovitě, f – podlouhlé, g – vláknité [16].



Obrázek 4: Tvary kvasinkových vřecek a spor [14].

2.2.3 Cytologie kvasinek

Buňky kvasinek se skládají z pevné buněčné stěny, cytoplazmatické membrány, cytoplazmy, která obsahuje různé buněčné orgány, a jádra. Jádro obsahuje chromozomy a je od cytoplazmy odděleno membránou [15].

2.2.3.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna kvasinek představuje 15 – 25 % hmotnosti sušiny buňky. Má pevnou, ale přesto pružnou strukturu, dává buňce tvar, chrání ji před mechanickým namáháním a osmotickými vlivy. Buněčná stěna obsahuje velké póry, kterými mohou volně procházet všechny sloučeniny kromě vysokomolekulárních polysacharidů a bílkovin. Složení a funkce buněčné stěny se vyvíjí v průběhu života buňky a v závislosti na životním prostředí. Struktura a chemické složení buněčné stěny byla nejlépe prozkoumána u *Saccharomyces cerevisiae*. Hlavními složkami buněčné stěny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jsou glukany, které tvoří přibližně 60 % sušiny, dále mananproteiny představující 25 – 50 % sušiny a chinin tvořící 1 – 2 % sušiny. U některých jiných kvasinek se kromě polymerů obsahující glukózu vyskytují i polymery s galaktózou, xylózou nebo rhamnózou [12, 15].

2.2.3.2 Cytoplazmatická membrána

Buněčnou stěnu kvasinek a cytoplazmatickou membránu spojuje periplazmatický prostor, který obsahuje především vylučované proteiny schopné procházet buněčnou stěnou. Cytoplazmatická membrána je vysoce selektivní bariéra, která ovládá výměny látek mezi buňkou a jejím vnějším prostředím. Je volně propustná jenom pro malé molekuly bez náboje a tvoří osmotické rozhraní buňky a vnějšího prostředí. Skládá se především z lipidů a bílkovin. Lipidy membrány jsou tvořeny převážně fosfolipidy a steroly amfifilního charakteru. Plazmatická membrána u *Saccharomyces cerevisiae* je tvořena přibližně 50 % bílkovin a 40 % lipidů. Glukany a mannany jsou přítomny pouze v malých množstvích [12, 15].

2.2.3.3 Cytoplazma

Cytoplazma se nachází mezi cytoplazmatickou membránou a jadernou membránou. V cytoplazmě kvasinek se nachází cytosol, což je gelovitá tekutina s pH 5 – 6, ve které se nachází enzymy, glykogen a ribosomy a je tedy místem mnoha důležitých chemických reakcí. Dále jsou v cytoplazmě přítomny buněčné organely – endoplazmatické retikulum, mitochondrie, Golgiho aparát a vakuoly [15, 17].

2.2.3.4 Endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát

Endoplazmatické retikulum je dvojitý membránový systém v cytoplazmě. Na povrchu těchto membrán v tzv. drsném endoplazmatickém retikulu se nachází ribozomy, v nichž probíhá syntéza povrchových a sekrečních proteinů. V hladkém endoplazmatickém retikulu, které ribozomy neobsahuje, probíhá syntéza lipidů. Takto vytvořené produkty jsou transportovány do Golgiho aparátu, který je tvořen souborem zploštělých membránových váček. V Golgiho aparátu jsou přijímané molekuly dále upravovány a směřovány do různých částí buňky či jejího okolí [17, 18].

2.2.3.5 Vakuoly

Jednou z nejnápadnějších složek cytoplazmy kvasinek jsou vakuoly. Jsou to kulovité organely o velikosti 0,3 – 3 μm obklopené jednoduchou membránou. Velikost a množství vakuol se odvíjí od fáze buněčného cyklu a stáří kvasinky. Ve vakuolách je zásoba některých buněčných hydroláz, zejména proteázy, ribonukleázy, esterázy a alkalické fosfatázy. Druhou hlavní funkcí vakuol je zásoba metabolitů před jejich využitím buňkou a dalších látek jako jsou např. polyfosfáty, draselné ionty, puriny, adenin a kyselina močová [12, 15].

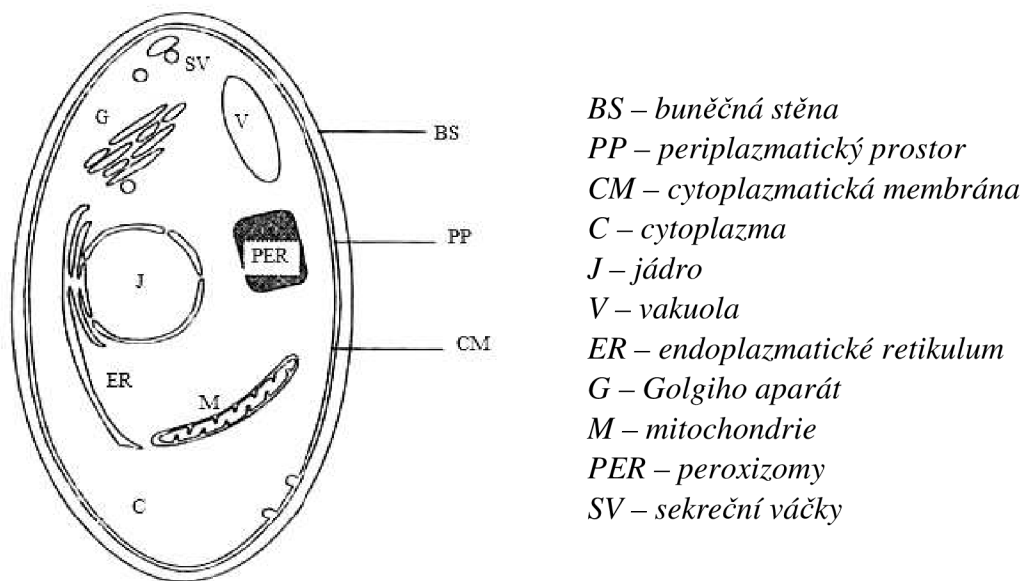
2.2.3.6 Mitochondrie

Mitochondrie jsou přítomny na okrajích cytoplazmy, jsou kulovité až protáhlé o velikosti jednoho až několika mikrometrů, uzavřené dvěma oddělenými membránami. Vnitřní membrána tvoří tzv. kristy, což jsou záhyby směřující dovnitř mitochondrie. Mitochondrie kvasinek jsou stejně jako u vyšších rostlin a živočichů rozděleny vnitřní membránou na vnitřní membránový prostor a matrix. Hlavní funkcí mitochondrií je tvorba chemické energie ve formě ATP oxidací molekul potravy. V buňce *Saccharomyces cerevisiae* je v aerobním prostředí přítomno přibližně 50 mitochondrií, kdežto v anaerobním jsou tyto organely

degenerovány, jejich vnitřní povrch se zmenšuje a krysty mizí. Anaerobní kvasinky ve svých buňkách mitochondrie úplně postrádají [15, 17].

2.2.3.7 Jádno

Nejdůležitější organelou v buňce kvasinek je jádro s průměrem přibližně 1,5 μm , které se nachází přibližně ve středu buňky a od cytozolu jej odděluje dvojitá jaderná membrána připojená k endoplazmatickému retikulu. Jaderná membrána obsahuje velké póry, které umožňují výměnu malých proteinů mezi jádrem a cytoplazmou. Jádro obsahuje genetickou informaci buňky, která je zakódovaná v sekvenci bází DNA. Genetická informace je uvnitř jádra přepisována do molekul RNA. Po úpravě zvané procesování se tyto molekuly transportují do cytosolu, kde řídí syntézu proteinů. Dvoušroubovice DNA tvoří s molekulami histonu chromatin, které jsou organizovány do struktur zvaných chromozomy. Z genetických studií byl stanoven počet chromozomů v jádře různých eukaryotních buněk. Nejlépe prozkoumaná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* má 16 chromozomů v haploidním jádře, diploidní jádro obsahuje dvojnásobný počet chromozomů. Pro srovnání u mouchy bylo pozorováno 8 chromozomů, u člověka 46 a u kapra 104 [3, 17, 18].



Obrázek 5: Strukturální rysy v idealizované buňce kvasinek [3].

2.2.4 Taxonomie kvasinek

Taxonomie je věda zabývající se identifikací jednotlivých druhů živých organismů, jejich popisem a zařazením do skupin podle původu a příbuznosti. Je známo asi 550 druhů kvasinek a kvasinkových mikroorganismů a je důležité je taxonomicky zatřídit kvůli jejich produktivitě a případné škodlivosti. I pro šlechtění a genetické úpravy mikroorganismů je nutné mít dobře definované kmeny a znát jejich genofond. V taxonomickém systému se organismy sdružují podle příbuznosti do druhů, což je nejnižší stupeň zařazení, příbuzné druhy se sdružují v rody, čeledě a řády. Rod, čeleď a řád patří mezi střední stupeň a vyšší stupně zařazení jsou oddělení

a třídy. Kvasinky a kvasinkovité organismy zařazujeme podle taxonomických pravidel do nadříše (Super-regnum) Eukaryota, říše (Regnum) Fungi, oddělení (Superphylum) Eumycota a třídy (Phylum) Zygomyceta, Ascomyceta nebo Basidiomyceta [12, 19].

2.2.5 Nejvýznamnější rody kvasinek při výrobě vína

Kvasinky hrají důležitou roli ve výsledném charakteru vína. Výsledný sensorický profil vína je výsledkem kombinace aromatických sloučenin, kterými jsou převážně estery, alkoholy, kyseliny, aldehydy a ketony. Tyto látky pochází buď přímo z hroznů podle konkrétní odrůdy, nebo vznikají při fermentaci či při procesu zrání. Enologové se již dlouhou dobu zajímají o ekologii kvasinek kvůli velkému významu přírodní mikroflóry na průběh a charakter kvašení. Znalost kvasinkové mikroflóry je také důležitá pro sledování zdrojů kvasinek způsobujících kažení a pro zjišťování důležitých informací o působení klimatických podmínek na mikroflóru. Díky těmto studiím se zvýšil zájem o možnosti použití smíšených kultur kvasinek na výrobu vína zejména kvůli ovlivnění vznikajícího aromatického profilu. Nejvíce prostudovanými kvasinkami z pohledu výroby vína jsou *Saccharomyces cerevisiae*, protože ty obvykle převládají v celém průběhu alkoholového kvašení. Přesto je známo až 15 dalších rodů, které mohou být přítomny při zahájení procesu kvašení a tím přispívat k speciálním charakteristikám jednotlivých druhů vín [20, 21].

Rozmanitost a podíl různých kvasinek v hroznovém moštu závisí na mnoha faktorech, jako jsou např. zeměpisné umístění, klimatické podmínky, odrůda, fyzické poškození způsobené plísněmi či škůdci a pěstitelské praktiky. Základními požadavky na kvasinky pro výrobu vín jsou tolerance na poměrně vysoké množství kyselin a cukrů v hroznovém moštu, dostatečná odolnost vůči ethanolu a adaptace na nízké koncentrace oxidu siřičitého, který je dodáván jako konzervační činidlo [22, 23].

U výroby vína spontánním kvašením, kdy je kvašení zprostředkováno pouze autochtonními kvasinkami z vinice, bylo zjištěno, že převládajícími kvasinkami na povrchu bobulí a tedy i na počátku kvasícího procesu v moštu jsou kvasinky rodu *Hanseniaspora*. Dalšími méně rozšířenými druhy kvasinek jsou *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Rhodotorula* a další. Populace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je v hroznové šťávě z počátku poměrně nízká. V průběhu kvašení, kdy se snižuje obsah živin a vzrůstá množství ethanolu, se zvyšuje selektivita média. Množství ne-*Saccharomycetních* kvasinek přítomných v hroznovém moštu začíná přibližně v polovině fermentace, kdy obsah ethanolu překročí 5 – 7 %, postupně klesat. V této fázi spontánního kvašení se tedy kvasinky rodu *Saccharomyces* stávají dominantními a dokončují kvašení. Snižováním teploty fermentace pod 15°C lze dosáhnout lepší adaptace na ethanol některých jiných druhů kvasinek, jako jsou např. *Hanseniaspora* a *Candida*, což významně přispívá k sensorickým vlastnostem vína [21, 22].

2.2.5.1 Rod *Brettanomyces*

Tento rod představuje asexuální formu rodu *Dekkera*. Kvasinky rodu *Dekkera* vytváří pohlavní askospory, kdežto kvasinky rodu *Brettanomyces* se rozmnožují pučením. Poprvé byl vydán přehled o rodě *Brettanomyces* v roce 1940 Custersem. Kvasinky tohoto rodu mají kulovité, elipsoidní, ale někdy až protáhlé buňky. Vytváří buď pseudomycelium, nebo jednobuněčné mycelium bez přehrádečného dělení. V aerobních podmínkách produkují z glukózy velké množství kyseliny octové a vytváří charakteristickou vůni. Některé kvasinky

tohoto rodu, např. *Brettanomyces bruxellensis*, jsou spojovány s nežádoucími změnami ve víně zejména v procesu zrání. Vytváří fenolické sloučeniny 4-ethylfenol, 4-ethylguaiacol a 4-ethylcatechol, které jsou zdrojem silného aroma a žluklé chuti připomínající koňský pot nebo spálený plast [5, 19].

2.2.5.2 Rod *Candida*

Název *Candida* byl odvozen od latinského slova candidus, což znamená bílý. Jedná se o rozsáhlý rod kvasinek s mnoha druhy a velmi rozmanitými tvary buněk. Kvasinky tohoto rodu se rozmnožují z pravidla multipolárním pučením. Při nedostatku živin a při nevhodných kultivačních podmínkách vytváří pseudomycelium, ale askosporu nevytváří. Tento rod zahrnuje jak druhy saprofytické, tak i potenciálně patogenní, které mohou způsobit mykotická onemocnění [19, 24].

2.2.5.3 Rod *Hanseniaspora*

Buňky mají tvar citronovitý, oválný až protáhlý. Kvasinky rodu *Hanseniaspora* se rozmnožují pučením a zpravidla se vytváří dobře vyvinuté pseudomycelium, jen někdy se tvoří zárodečné mycelium nebo se netvoří vůbec. Při pohlavním rozmnožování tvoří tři typy askospor – kloboučkovité, kulovité s hladkou stěnou a kulovité s bradavičnatou stěnou. Tyto kvasinky zkvašují sacharidy, neasimilují nitrát a pro svůj metabolismus potřebují v prostředí přítomnost inozitolu a pantotenátu [19].

2.2.5.4 Rod *Kluyveromyces*

Druhy kvasinek rodu *Kluyveromyces* se původně zařazovaly do rodu *Saccharomyces*, ale podrobnějším zkoumáním se dokázalo, že se odlišují morfologickými i fyziologickými vlastnostmi. Tyto kvasinky proti kvasinkám *Saccharomyces* mají menší a jemnější buňky a snadněji tvoří pseudomycelium. Dalším rozdílem je utilizace větší škály sacharidů, avšak zvládají vytvořit pouze 4 – 4,5 % ethanolu a navíc produkují ethylacetát [12, 19].

2.2.5.5 Rod *Pichia*

Rod *Pichia* patří mezi rody s největším počtem druhů. Jsou to obvykle kvasinky s nízkými kvasnými schopnostmi. Fermentují buď pouze glukózu, nebo u nich fermentace neprobíhá. Mají obvykle protáhlé vegetativní buňky a tvoří pseudomycelia. Spory mají kloboukovitý, kulatý, saturnovitý nebo hranatý tvar. Ve víně i jiných tekutinách mohou někdy na povrchu vytvářet vzlínavou blanku zvanou křís. Při výrobě vína je jejich význam zejména v raných stádiích kvašení, kdy produkují charakteristické aromatické látky. Některé kmeny se využívají například při výrobě fermentovaných sýrů [24, 25].

2.2.5.6 Rod *Rhodotorula*

Název *Rhodotorula* pochází z řeckého slova rhodeos, znamenajícího růžový a latinského slova torulus, které se překládá jako hrbolek. Tento rod tvoří fermentačně neaktivní kvasinky, to znamená, že nezksvašují žádné cukry. Mají však velmi dobře vyvinutý pentózový cyklus pro využití glukózy. Jedná se o kvasinky obsahující karotenoidní barviva, která vytváří oranžové až červené zbarvení kolonií. Karotenoidní barviva je chráněná před účinkem ultrafialové složky

slunečního záření, proto se vyskytují často v ovzduší. Buňky rodu *Rhodotorula* jsou kulovité a tvoří pseudomycelium [12, 19, 24].

2.2.5.7 Rod *Saccharomyces*

Název vznikl z řeckých slov sakcharon, což znamená cukr a mykés přeloženo do češtiny znamená houba. Zástupci rodu *Saccharomyces* byly vůbec prvními objevenými kvasinkami v roce 1838. Kvasinkové buňky se vyznačují kulatým, oválným i protáhlým tvarem. Vegetativně se rozmnožují multipolárním pučením a vegetativní stadium buněk je až na výjimky diploidní. Mezi buňkami dochází také ke konjugaci za vzniku kulatých pohlavních spor s hladkým povrchem. Kvasinky rodu *Saccharomyces* velmi bouřlivě zkvašují sacharidy a neutilizují nitráty.

Saccharomyces cerevisiae – druhové jméno pochází s latinského slova *cerevisiae* překládané jako pivo. *Saccharomyces cerevisiae* patří k velmi rozšířeným kvasinkám v přírodě a jsou nepatogenní. Jsou to kvasinky, které byly důkladně studovány a často používány jako modelový organismus k fyziologickým a genetickým výzkumům. Mají dobré fermentační schopnosti a využívají se kromě vinařství i v pivovarnictví, lihovarnictví a pekařství [19, 24].

2.2.5.8 Rod *Saccharomyces*

Podobně jako *Saccharomyces* patří mezi rody kvasinek vyznačující se silnými fermentačními schopnostmi. Kvasinky rodu *Saccharomyces* vytváří velké diploidní citronovité nebo protáhlé buňky. Vegetativní rozmnožování probíhá bipolárním pučením, kdy je pupen s mateřskou buňkou propojen širokým krčkem a poté se odděluje přehrádkou, přičemž kvasinky mohou pučet na obou pólech současně. Při pohlavním rozmnožování se vytváří vřeska se čtyřmi kulovitými spory s hladkou stěnou, které se po vyklíčení hned spojují, takže u nich vůbec nelze pozorovat haploidní vegetativní fázi [19, 24].

2.2.5.9 Rod *Schizosaccharomyces*

Zvláštností tohoto rodu je, že se tyto kvasinky jako jediné rozmnožují stejně jako bakterie dělením. Buňky těchto kvasinek mají obdélníkový tvar a tvoří mycelium. Charakteristickým znakem je tvorba askospor. Ve vinařství se využívají k odkyselování vín, protože dovedou metabolizovat přítomnou kyselinu vinnou a jablečnou [24].

2.2.6 Autochtonní kvasinky

Použití vybraných komerčních kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pro výrobu vína je proti tradičnímu způsobu spontánní fermentace výhodné. Obvykle je konečný produkt kvalitnější než víno vyrobené spontánním kvašením, protože rozmanitost původních kmenů může produkovat vína s odlišnými vlastnostmi a není zde zaručen dobrý sensorický profil produktu. Aby se zabránilo nepředvídatelnosti spontánní fermentace moštu, používají vinaři vyšlechtěné kultury ve formě aktivních suchých vinných kvasinek (ASVK). Jejich výroba a použití se začala rozvíjet ve Spojených státech amerických již před několika desítkami let. Přídavkem ASVK se brání rozvoji ne-*Saccharomyces* kultur a výsledkem je produkce sensoricky reprodukovatelných, uniformních, avšak méně zajímavých typů vína [26, 27, 28].

ASVK jsou velmi dobře přizpůsobivé na životní prostředí vinice a vinařství a jejich používání proto může mít negativní dopad na biodiverzitu přírodních kvasinek v daném prostředí. Několika studii bylo zjištěno, že použitím ASVK se v průběhu několika let snížila různorodost a význam původních kmenů *Saccharomyces cerevisiae* ve vinařství. Kromě toho bylo také zjištěno, že některé komerční kmeny mají tendenci ve vinařství postupně dominovat a převzít hlavní úlohu i ve spontánní fermentaci [29].

Nejen z těchto důvodů dochází v posledních letech ke zvyšování použití vybraných autochtonních neboli původních kvasinek pro řízené kvašení. Kvasinky izolované přímo z prostředí vinice se zdají být pro výrobu vína vhodnější než kvasinky zahraniční, protože se předpokládá, že tyto místní kvasinky budou po zakvašení konkurenceschopné a lépe se aklimatizují na životní podmínky. Výběrem vhodných autochtonních kvasinek se také zajistí zachování nebo i zlepšení typických sensorických vlastností vína produkovaného v daném regionu [26, 27].

Autochtonní kvasinky izolované z daného regionu mohou tvořit přidanou hodnotu ve vínech originální certifikace. Vína originální certifikace jsou vína, která splňují zákonné požadavky. Těmi jsou např. víno musí být vyrobeno na stejném nebo menším území, než je vinařská oblast. Výrobce musí být členem sdružení, které je oprávněné přiznávat označení vína originální certifikace. Víno odpovídá alespoň jakostním požadavkům pro jakostní víno a splňuje podmínky stanovené v rozhodnutí o povolení přiznávat označení vína originální certifikace [47].

2.2.7 Metabolismus kvasinek

Ve všech živých organismech probíhá neustálá přeměna látek, která zajišťuje dostatečné množství energie a stavebních látek v buňkách, kvůli zachování jejich životních funkcí. Syntéza a rozklad chemických látek nebo obecně soubor biochemických reakcí v organismu se nazývá metabolismus, jehož intenzita je u kvasinek závislá na vnějších podmínkách. Při dostatečném přísunu živin, vhodné teplotě a pH prostředí dochází velmi rychle k chemickým reakcím v metabolických drahách, které společně umožňují buňce přežít, růst a rozmnožovat se. Při nedostatku živin a nevhodných podmínkách prostředí se buňky nerozmnožují, metabolismus kvasinek se zpomaluje a jeho funkce spočívá pouze v uchování životně důležitých dějů.

K ovládní chemických reakcí využívá buňka enzymy, které jednotlivé reakce katalyzují. Enzymaticky katalyzované reakce tvoří spojitě metabolické dráhy, které rozdělujeme do dvou kategorií. První jsou disimilační neboli katabolické procesy, zajišťující zisk energie a stavebního materiálu odbouráváním živin na menší molekuly. Druhým typem procesů jsou asimilační neboli anabolické, což jsou procesy syntézy buněčné hmoty, které využívají energii vytvořenou organismem v katabolismu [12, 17].

2.2.7.1 Zdroje uhlíku a energie v hroznovém moštu

Kvasinky obecně jako zdroj uhlíku a energie využívají různé monosacharidy, disacharidy a případně oligosacharidy. Některé kvasinky produkující extracelulární enzymy dokážou hydrolyzovat také škrob. Jako zdroj uhlíku však mohou sloužit i další látky jako je ethanol, methanol, glycerol, laktát apod. [14].

Zralé bobule révy vinné obsahují značné množství cukru, především glukózu, fruktózu a také malé množství sacharózy. Tento ideální zdroj uhlíku a energie je před kvasinkami a dalšími mikroorganismy, které se nachází na povrchu bobulek, chráněn pevnou slupkou.

Porušením slupky při lisování dochází k uvolnění glukózy a fruktózy, přičemž využívání glukózy kvasinkami začíná okamžitě, takže dochází k neustálému zvyšování poměru fruktóza/glukóza. Příčinou přednostního zpracování glukózy je přítomnost většího množství hexózových přenašečů v buňkách kvasinek a také množství hexokináz, přítomných v buňkách, které přijatou glukózu okamžitě fosforylují [30].

2.2.7.2 Pasteurův efekt

Většina kvasinkových buněk zpracovává zdroje uhlíku za aerobních podmínek glykolýzou a navazujícím Krebsovým cyklem a fermentující kvasinky fermentační cestou. Míru respirace či fermentace u kvasinek ovlivňuje řada faktorů. Nesrovnatelně energeticky výhodnější je za aerobních podmínek zpracování cukru respirací. Při dostatečném zásobování kyslíkem tedy klesá spotřeba cukru. Tento jev nazýváme Pasteurův efekt, jehož rozsah závisí na podílu respirace a fermentace u konkrétní kvasinky. Téměř nevýrazný je u převážně fermentujících kvasinek, např. *Saccharomyces cerevisiae*, ale výrazně se projevuje u kvasinek s převažující respirací, např. *Candida*, kde může být fermentace v aerobióze inhibována až z 95 %. Výsledkem tedy je zpracování pyruvátu v Krebsově cyklu a potlačení zpracování pyruvátu fermentací a tedy jeho přeměny na ethanol [14, 31].

2.2.7.3 Custersův efekt

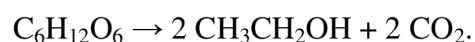
Naopak u kvasinek rodu *Brettanomyces* probíhá fermentace rychleji za aerobních podmínek. Tento jev označovaný jako Custersův efekt souvisí s produkcí velkého množství kyseliny octové těmito kvasinkami. Kyselina octová vzniká oxidací pyruvátu pomocí aldehyddehydrogenázy za současného snižování volného NAD^+ v systému, takže dochází ke zpomalování průběhu glykolýzy. Při dostatečném množství kyslíku v prostředí se reoxiduje NADH_2 na NAD^+ v respiračním řetězci, takže dochází k rychlejšímu průběhu glykolýzy a následného fermentačního procesu [14].

2.2.7.4 Crabtree efekt

Crabtree efekt neboli katabolická represe působí v opačném směru než Pasteurův efekt. Jedná se o komplexní projev vlivu glukózy na syntézu a aktivitu enzymů Krebsova cyklu a složek respiračního řetězce, které umožňují utilizaci jiných zdrojů uhlíku. To znamená, že v přítomnosti vyššího množství glukózy v hroznovém moštu, uvádí se 9 g/l, převažuje i v aerobních podmínkách fermentace nad respirací a je potlačována schopnost využití jiných zdrojů uhlíku než glukózy a fruktózy. Tento efekt se tedy s výhodou využívá při kvašení vína, protože hroznový mošt obsahuje vysokou koncentraci glukózy [31].

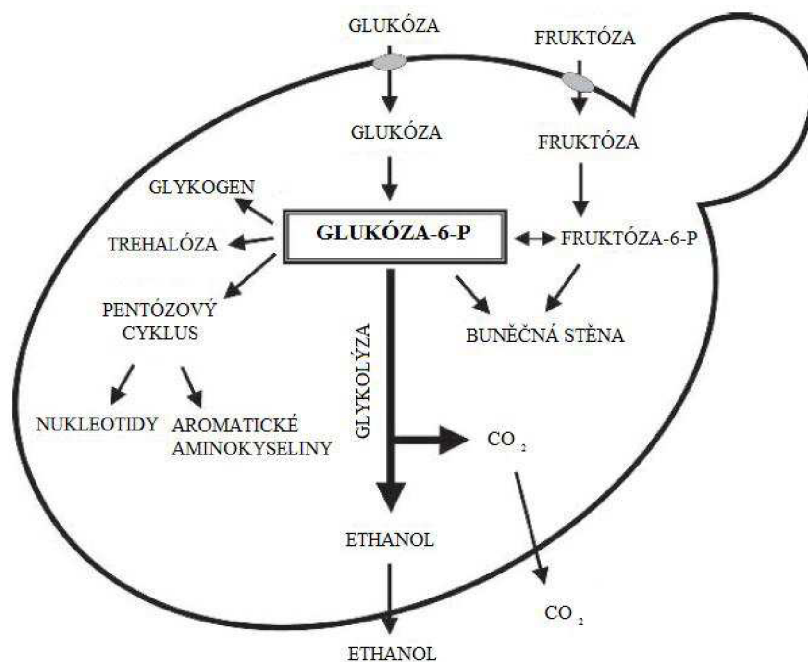
2.2.7.5 Ethanolová fermentace

Ethanolová fermentace je anaerobní transformace cukrů, v hroznovém moštu se jedná převážně o glukózu a fruktózu, na ethanol a oxid uhličitý. Tuto reakci vyjadřujeme souhrnnou chemickou rovnicí:



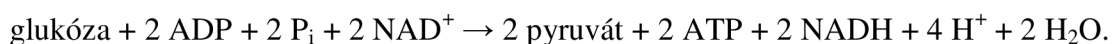
K využití cukrů jako zdroje uhlíku a energie je potřeba jejich zavedení do buňky kvasinky a transformace na meziprodukt schopný glykolytického zpracování. Glukóza a fruktóza jsou

transportovány do buňky pomocí pasivní difúze nebo aktivního transportu pomocí přenašečů přes cytoplazmatickou membránu. Jakmile jsou uvnitř buňky, jsou fosforylovány působením několika specifických kináz, které katalyzují první nevratný krok glykolýzy. Hexokináza je relativně nespecifický enzym, který přenáší fosfátovou skupinu mezi molekulami ATP a různými hexózy, glukokináza využívá jako substrát glukózu nebo manózu. Tímto způsobem vzniká z glukózy glukóza-6-fosfát, která je důležitým metabolitem v systému odbourávání cukrů v metabolismu (viz obrázek 6). Tato reakce sice spotřebovává ATP, ale udržuje nízkou koncentraci glukózy a fruktózy uvnitř buňky, takže zabezpečuje jejich kontinuální transport přes cytoplazmatickou membránu z vnějšího prostředí [18, 30, 31].



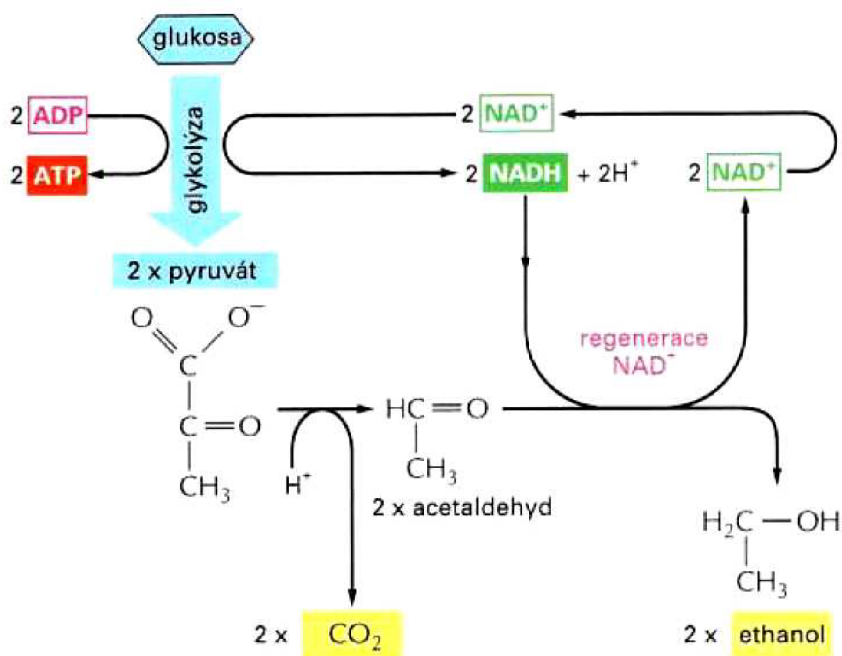
Obrázek 6: Ústřední role glukóza-6-fosfátu v metabolismu sacharidů u kvasinek [30].

Fosforylace glukózy na glukóza-6-fosfát je prvním krokem glykolýzy. Slovo glykolýza pochází z řeckých slov glucus, což znamená sladký a lysis, překládáno jako rozpad. Glykolytická dráha je systém 11 postupných chemických reakcí, který odbourává glukózu za vzniku 2 molekul pyruvátu a odehrává se ve většině organismů v cytoplasmě. Glykolýza celkově zahrnuje vklad 2 molekul ATP pro vznik fosforylované sloučeniny fruktóza-1,6-bisfosfátu, která je dále rozštěpena na dvě jednotky C₃. Volná energie vznikající při oxidaci meziproductů se ukládá do makroergických sloučenin, které se poté využívají na fosforylaci molekul ADP na ATP. Celková reakce glykolýzy je:



Samotná alkoholová fermentace je reakce, kdy je za anaerobních podmínek regenerován redukovaný kofaktor NADH, aby mohla pokračovat glykolýza. Jak již bylo zmíněno, podstatou reakce je přeměna pyruvátu a produkce ethanolu a oxidu uhličitého. Fermentace probíhá ve dvou krocích. První reakce je dekarboxylace pyruvátu pomocí pyruvát-dekarboxylázy na acetaldehyd za vzniku oxidu uhličitého. Druhým krokem je redukce

acetaldehydu na ethanol katalyzovaná alkoholodehydrogenázou za současné oxidace redukovaného kofaktoru NADH na NAD^+ , který se vrací do glykolýzy. Celkový energetický ziskem anaerobním odbouráním hexózy jsou tedy 2 molekuly ATP (viz obrázek 7) [18, 31].



Obrázek 7: Fermentace pyruvátu na ethanol a CO_2 [34].

Teoretický výtěžek alkoholové fermentace je 51,1 %, což znamená, že ze 100 g cukru vznikne 51,1 g ethanolu. V praxi se však dosahuje výsledků pouze 47 až 48 g. Produkce oxidu uhličitého je nebezpečná v případě neodvětrávaného sklepa, kde hrozí nebezpečí jeho nadýchání, přičemž smrtelná koncentrace tohoto plynu je 18 % obj. [6, 32].

Kvašení vinného moštu bylo tradičně prováděno ve velkých dřevěných kádích nebo v betonových nádržích, ale v dnešní době je vinaři často nahrazují nerezovými tanky, které se snadno sanitují a mají dobré zařízení pro řízení teploty a ostatních parametrů. Bílá vína obvykle kvasí při teplotě 10 – 18°C po dobu 7 – 14 dní, přičemž nízká teplota a pomalá fermentace určují množství přítomných aromatických látek. Červená vína kvasí přibližně 7 dní při teplotě 20 – 30°C, kde je vysoká teplota nezbytná pro extrakci barviv ze slupky hroznů [33].

2.3 Identifikace kvasinek

Dříve, než byly objeveny a používány molekulární metody identifikace mikroorganismů, se pro identifikaci jednotlivých druhů a kmenů kvasinek využívaly tradiční metody založené na základě sledování fyziologických a morfologických vlastností. Tradiční způsob je však velmi pracný a časově náročný, zahrnuje izolaci, kultivaci a složitou charakterizaci jednotlivých druhů. Problémem tradičního způsobu identifikace kvasinek ve vínech je také přítomnost tzv. vitálních, ale nekultivovatelných neboli VBNC („viable but non-culturable“) kvasinek, což je

stav způsobený stresovými faktory, jako jsou např. teplota, stáří kultury a obsah kyslíku v médiu. Kvasinky ve stavu VBNC jsou tedy životaschopné a vykazují detekovatelnou metabolickou aktivitu. Nelze je však nakultivovat a tradičními metodami je nelze správně detekovat, což vede k chybným výsledkům identifikace [22, 35, 36].

V poslední době byly vyvinuty metody na základě analýzy celkového množství proteinů v buňce nebo analýzy mastných kyselin přítomných v buňce plynovou chromatografií. Nicméně reprodukovatelnost těchto analytických technik je problematická, neboť v mnoha případech závisí na fyziologickém stavu buňky [22].

Proti tomu techniky využívající molekulární biologie jsou považovány za dobrou alternativu k tradičním metodám identifikace mikroorganismů, protože jsou schopny identifikovat genom nezávisle na fyziologickém stavu buněk [22].

2.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA je proces separace a koncentrace DNA z buněk, tkání nebo konkrétních prostředí. Je prvním krokem pro identifikaci kvasinek pomocí PCR technik. Je důležité zajistit, aby se izolace DNA prováděla z čisté kultury. Z mikrobiální populace získané buď přímo na vinici, nebo z hroznového moštu se čistá kultura izoluje postupným zředěvacím způsobem tak, aby se kolonie rozmnožovaly z jedné buňky. Také samotná izolace DNA již přečištěné kultury musí být prováděna tak, aby byl vzorek čistý a obsahoval pouze molekuly DNA jednoho druhu kvasinek. Na základě chemických vlastností deoxyribonukleové kyseliny se její izolace provádí buď fenol-chloroformovou extrakcí nebo pomocí komerčních setů určených pro izolaci DNA [16, 37, 38].

2.3.2 Technika RFLP-PCR pro taxonomické zařazení kvasinek

Molekulární technika taxonomického zařazení mikroorganismů se skládá z polymerázové řetězové reakce a restrikční analýzy. Velikost amplikonu po PCR je prvním znakem určitého druhu kvasinek a pomocí restrikčních analýz jednotlivými restrikčními endonukleázami získáme specifické délky fragmentů, podle kterých lze kvasinky zařadit [4].

2.3.2.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR je zkratka pro polymerázovou řetězovou reakci, která představuje amplifikaci (kopírování) určitého úseku DNA *in vitro* termostabilní DNA polymerázou. PCR byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem. Je možné amplifikovat úseky DNA dlouhé až stovky bází, přičemž k vytvoření milionů kopií daného úseku DNA dochází během několika hodin. Kopírovaný úsek se nazývá amplikon a je pro amplifikaci označen dvojicí primerů. Primery jsou oligonukleotidy, které specificky nasedají na komplementární části tepelně denaturované dvoušroubovice templátové DNA. DNA polymeráza poté syntetizuje komplementární vlákno k amplikonu [4, 39].

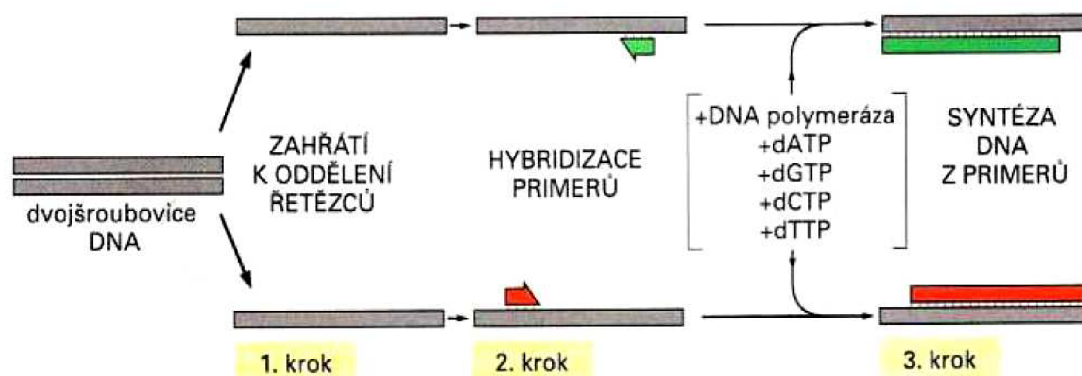
Celá reakce probíhá *in vitro*, kde se vzorek DNA inkubuje s DNA polymerázou, volnými nukleotidy a dvojicí primerů. PCR obvykle probíhá ve 25 – 45 teplotních cyklech, které zahrnují denaturaci DNA, připojení primerů a následnou polymeraci DNA polymerázou. Výsledkem každého cyklu je dvojnásobné množství amplifikovaného úseku DNA, takže s každým dalším cyklem vzrůstá jeho počet exponenciálně [18, 22].

Úvodním krokem je počáteční denaturace dvoušroubovice molekuly DNA neboli její oddělení na dvě samostatná vlákna, na která se mohou připojit primery. Denaturace probíhá při teplotě 94 – 95°C po dobu několika minut. Dále následuje opakování teplotních cyklů, přičemž prvním krokem je vždy denaturace při 94 – 95°C, která trvá kratší dobu než úvodní několika minutová denaturace. Tento první krok opakujících se cyklů obvykle netrvá déle než 1 minutu.

Druhým krokem cyklu je specifické připojení primerů na místa ohraničující amplicon z obou stran. Teplota připojení primerů se pohybuje mezi 45 – 65°C. Jedním z důvodů širokého rozmezí teplot je rozdílná procentuální přítomnost bází guaninu a cytosinu v primerech. Příklad při vyšším procentuálním zastoupení C a G bází v primeru je potřeba vyšší teplota připojení, aby se zabránilo nekomplementárnímu nasednutí primerů k templátovému řetězci DNA. Nekomplementární nasednutí primerů by v důsledku znamenalo vznik nespecifických produktů PCR. U identifikace kvasinek se obvykle používají primery ITS1 a ITS4, jejichž teplota připojení se pohybuje kolem 58°C a tento krok trvá přibližně 1 minutu.

Třetím krokem cyklu je samotná polymerázová reakce, která probíhá při teplotě 72°C a doba polymerace se v každém cyklu pohybuje okolo 2 minut. Jak již bylo zmíněno, polymerací vzniká komplementární vlákno DNA k ampliconu prodloužením primerů přidáváním volných nukleotidů ve směru od 5' ke 3' konci. Kvůli vysoké teplotě denaturace DNA se využívá termostabilní *Taq* polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Kdyby docházelo k denuraci enzymu, který polymerázovou reakci katalyzuje, musel by se při každém cyklu opětovně dodávat. Proto se využívá *Taq* polymeráza, která si udržuje aktivitu i při teplotách kolem 95°C.

Další cyklus začíná opět denurací DNA úseků a to včetně nově vytvořených v předcházejícím kroku [5, 20, 22, 37].



Obrázek 8: První cyklus polymerázové řetězové reakce [34].

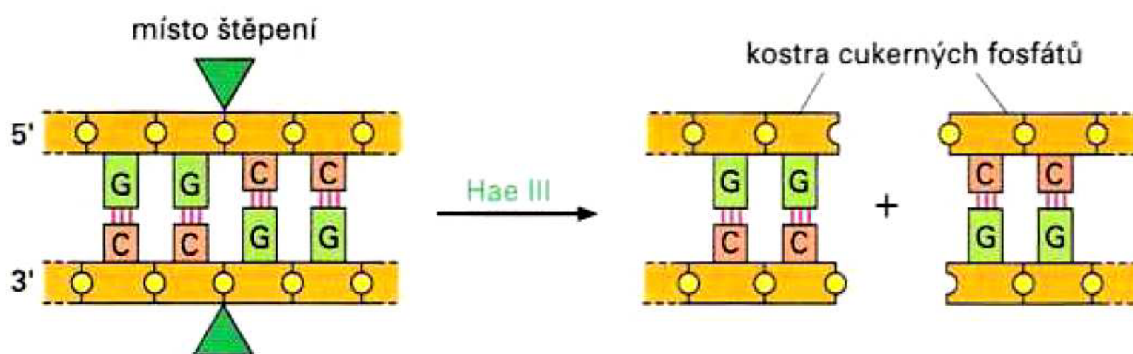
2.3.2.2 Restrikční analýza

RFLP neboli délkový polymorfismus restrikčních fragmentů je metoda identifikace mikroorganismů. Je založená na existenci specifických enzymů nazývaných restrikční endonukleázy, které štěpí DNA podle specifických sekvencí v tzv. restrikčních místech. Pro restrikční analýzu se často používá amplifikovaná DNA pomocí PCR kvůli vysokému množství stejného úseku DNA. Restrikční místa na DNA, ve kterých restrikční endonukleázy štěpí, jsou obvykle krátká a obsahují 4 – 8 nukleotidových párů, takže je poměrně velká

pravděpodobnost výskytu těchto míst v různých molekulách DNA. Štěpením DNA pomocí jednoho enzymu vznikají v každé analýze dané molekuly DNA stejné specifické fragmenty, podle kterých se daný mikroorganismus identifikuje. Tyto fragmenty jsou stejně jako produkty PCR vyhodnoceny pomocí gelové elektroforézy.

Restrikční endonukleázy jsou izolovány z různých mikroorganismů, převážně z bakterií, a jejich název je vždy sestaven z prvního písmene rodu a prvních dvou písmen druhu, ze kterého byl daný enzym izolován. Dnes již bylo charakterizováno více než 400 restrikčních endonukleáz, které štěpí molekuly v různých specifických místech [17, 40, 41].

Pro identifikaci kvasinek se využívají restrikční endonukleázy např. *HaeIII*, která je izolovaná z *Haemophilus aegypticus* a *HinfI* izolovaná z *Haemophilus influenzae* [5].



Obrázek 9: Rozpoznávací a štěpená nukleotidová sekvence restrikční endonukleázy *HaeIII* [34].

2.3.3 Identifikace úseků DNA pomocí gelové elektroforézy

Elektroforéza patří mezi separační elektromigrační techniky, které využívají k rozdělení vzorků pohyb nabitých částic v elektrickém poli. Pokud jsou částice nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a jsou umístěny do elektrického pole, začnou se posunovat konstantní rychlostí odpovídající velikosti jejich nábojů. Anionty se budou pohybovat k anodě a kationty ke katodě. Musíme vzít v úvahu, že pohybující se částice jsou vystaveny při průchodu prostředím odporu sil vnitřního tření. Čím jsou částice větší a jejich náboj je menší, tím se jejich mobilita snižuje a naopak. Dobré separace látek ze směsi dosáhneme pouze tehdy, pokud tyto látky mají rozdílnou elektroforetickou mobilitu [42].

K rozdělení, identifikaci a purifikaci úseku DNA, tzn. PCR produktů a restrikčních fragmentů, se používá gelová elektroforéza s užitím agarozového nebo polyakrylamidového gelu. Typ a koncentrace gelu, které zajišťují různou velikost pórů, se volí podle různých molekulových hmotností separovaných fragmentů DNA. Vhodné napětí a doba trvání elektroforézy se volí podle vzdálenosti elektrod. Molekuly DNA jsou záporně nabitě, takže putují ke katodě a rozdělují se na základě velikosti, přičemž nejmenší molekuly urazí v gelu nejdelší vzdálenost. Pro vyhodnocení jednotlivých separovaných fragmentů se do gelu a pufru přidává ethidium bromid jako interkalační činidlo, které se váže mezi vlákna DNA a po ozáření UV zářením o vlnové délce 260 – 360 nm fosforeskuje. Pro posouzení velikosti jednotlivých rozdělených fragmentů se používají délkové standarty, což jsou komerčně dostupné směsi fragmentů DNA s definovanými velikostmi. Separované úseky DNA mohou být z gelu separovány a použity pro další analýzy [37, 42].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie, přístroje a pomůcky

3.1.1 Mikroorganismy

Testované kmeny kvasinek pro rozšíření databáze pocházely ze sbírky mikroorganismů CCY – Culture Collection of Yeasts, Bratislava, SR: *Yarrowia lipolytica* (kontaminovaná půda), *Yarrowia lipolytica* (kukuřice), *Wickerhamomyces anomalus* (list švestky), *Wickerhamomyces anomalus* (květy švestky), *Wickerhamomyces anomalus* (neznámý původ), *Zygosaccharomyces balilii* (Type), *Pichia kudriavzevii* (játra žáby), *Pichia kudriavzevii* (květy švestky), *Issatchenkia occidentalis* (tropické ovoce), *Pichia sporocuriosa* (plod švestky), *Pichia scapomyzae* (list třešně), *Pichia manshurica* (plod hrušně), *Pichia manshurica* (Japonská sbírka MO), *Pichia membranifaciens* (plod švestky), *Pichia membranifaciens* (sediment z jezera), *Pichia fermentans* (plod hrušky), *Pichia fermentans* (voda řeky Moravy), *Pichia fermentans* (voda Morava), *Debaryomyces hansenii* (květy hrušně), *Debaryomyces hansenii* (plod broskvoně), *Debaryomyces hansenii* (zatravněná půda), *Torulaspora delbrueckii* (dub), *Sporobolomyces roseus* (voda Morava), *Sporobolomyces roseus* (listy javoru), *Torulaspora delbrueckii* (neznámý původ), *Torulaspora delbrueckii* (neznámý původ), *Meyerozyma guilliermondii* (list jabloně), *Hanseniaspora guilliermondii* (voda z jezera), *Hanseniaspora uvarum* (hrozny), *Hanseniaspora uvarum* (plod jabloně).

Vzorky kvasinek pro testování byly získány izolací v období října a listopadu 2013 z bílého vína odrůdy Veltlínské zelené vypěstované na jižní Moravě u obce Kobylí a pochází z vinařství OENOGALA.

3.1.2 Chemikálie

- 10× Taq pufr pro PCR mix (Kapa Biosystems, USA)
- Agar, kvasniční extrakt (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie)
- Agaróza pro elektroforézu DNA (Serva Biotech, Německo)
- Délkový standard 20 bp (Takara Bio Inc., Japonsko)
- Délkový standard 100 bp (Elizabeth Pharmacon s. r. o., ČR)
- dNTP mix (Kapa Biosystems, USA)
- Ethanol bezvodý pro UV spektrometrii – C₂H₅OH (Mach chemikálie s. r. o., ČR)
- Ethidium bromid (Serva Bitech, Německo)
- Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon)
- Kyselina propionová (Raechim, Rusko)
- Nanášecí pufr Loading buffer (Fermentas, Litva)
- Parafínový olej
- Primery ITS1, ITS4 (Kapa Biosystems, USA)
- Quant-iT™ ds DNA HS Assay Kit 0,2 – 100 ng
- Restrikční endonukleasy – *Hae*III, *Hinf*I, *Hha*I, *Mse*I (BioLabs, TaKaRa)
- Sladina (pivovar Starobrno s.r.o., ČR)
- Sterilní a deionizovaná voda
- Streptomycin sulfát (Himedia, Indie)
- Taq DNA polymeráza (Kapa Biosystems, USA)
- CH₃COONa, EDTA, H₃BO₃, HCl, NaOH, Na₂CO₃, Tris

3.1.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Bakteriologické kličky
- Buničitá vata
- Bunsenův kahan
- Centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf AG, Německo)
- Elektroforetická vana Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (Biotech s.r.o., ČR)
- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety pipet4u (AHN Biotechnologie GmbH, Německo)
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR)
- Mikrozkumavky Eppendorf
- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Parafilm (American Nacional Can™, USA)
- PCR box AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Plastové Petriho misky
- Předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Sušárna (Binder, Německo)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci
- Termocyklér PTC-100™, (MJ Research, Inc, USA)
- Termostat IP 100-U (LTE SCIENTIFIC, Velká Británie)
- Transluminátor (Ultra Lum. Inc, USA)
- Vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR)
- Vortex-Genie 2, MO Bio (Biotech s.r.o., ČR)

3.2 Kultivační média a použité roztoky

3.2.1 Příprava kultivačního média

Kultivační médium pro izolaci a množení kultur kvasinek bylo připraveno ze sladidového extraktu. Sladidový extrakt je sirupovitá kapalina, která se získává extrakcí z ječmenného sladu ve vodě. 200 ml sladiny z pivovaru bylo nalito do odměrného válce o objemu 500 ml, roztok byl zředěn vodou na cukernatost 7°ČSN a pH roztoku bylo upraveno na 6,8 uhličitanem sodným. Upravený roztok byl nalit do Erlenmayerových baněk a do nich byla přidána agaróza v koncentraci 1 – 3 % hm. Vzniklá směs byla varem promíchána a poté 20 minut sterilizována. Připravené kultivační médium bylo v množství přibližně 15 ml nalito do Petriho misek do výšky 3 – 5 mm. Do zkumavek bylo pro přípravu šikmých agarů pipetováno množství sterilního média odpovídající ¼ objemu zkumavky [16].

3.2.2 Příprava kultivačního média s antibiotikem a kyselinou propionovou

Na přípravu deseti Petriho misek s kultivačním médiem bylo připraveno antibiotikum streptomycin sulfát v dávce 80 µg/ml. Bylo naváženo 0,12 g streptomycin sulfátu a navážené

množství rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Připravený roztok antibiotika byl přidán do 150 ml sterilního kultivačního média v Erlenmayerově baňce. Dále bylo naváženo 0,375 g kyseliny propionové a toto množství bylo také přidáno do kultivačního média. Takto připravené médium bylo rozlito do Petriho misek [16].

3.2.3 Příprava ethidium bromidu

Pro přípravu zásobního roztoku EtBr bylo naváženo 10 mg EtBr do mikrozkuřavky Eppendorf a navážené množství bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Takto připravený roztok EtBr byl použit pro vizualizace fragmentů na gelu [43].

3.2.4 Příprava 10×TBE pufru

Pro přípravu zásobního roztoku TBE pufru byl nejdříve nachystán 0,5 M roztoku EDTA tím způsobem, že bylo naváženo 9,36 g EDTA. Navážené množství bylo převedeno do kádinky, bylo přidáno 20 ml destilované vody a upraveno pH na hodnotu 8 koncentrovaným roztokem NaOH. Tato směs byla 30 minut rozmíchávána na elektrické míchačce do úplného rozpuštění EDTA. Tento roztok byl převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a byl doplněn po rysku destilovanou vodou. Z promíchaného roztoku bylo odebráno 40 ml a nalito do 1000 ml odměrné baňky. K roztoku bylo dále přidáno 108 g Tris a 55 g H₃BO₃. Vše bylo rozpuštěno a doplněno destilovanou vodou po rysku [43].

3.2.5 Příprava 1×TBE pufru

Pro přípravu 1×TBE pufru, který byl použit k přípravě gelů pro elektroforetickou detekci DNA fragmentů, bylo ze zásobního roztoku odebráno 100 ml do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněno destilovanou vodou po rysku. Pro přípravu vodivostního pufru pro elektroforézu bylo k 100 ml 1×TBE pufru přidáno 100 μl roztoku EtBr [43].

3.2.6 Příprava délkových standardů 100 bp a 20 bp

Délkový standard 100 bp byl dodán v připravené formě. Na gel byl nanášen v objemu 3 μl. Délkový standard 20 bp byl připraven podle dodávaného návodu následujícím způsobem. Pro přípravu délkového standardu bylo smícháno 2,5 μl 20 bp DNA, 2,5 μl sterilní destilované vody a 1 μl nanášecího pufru dodávaného společně s 20 bp DNA. Takto připravený délkový standard byl aplikován na gel v celkovém objemu 6 μl.

3.2.7 Příprava 2% agarózového gelu

Pro elektroforetickou detekci DNA fragmentů byl použit 2% agarózový gel připravený z 2 g agarózy smíchané se 100 ml 1×TBE pufru v Erlenmayerově baňce. Připravená směs byla opakovaným varem v mikrovlnné troubě dokonale rozpuštěna.

3.2.8 Příprava octanového pufru

Bylo naváženo 2,46 g CH₃COONa a tohle množství bylo rozpuštěno v 7 ml destilované vodě. Přídavkem koncentrované HCl bylo upraveno pH na hodnotu 5,5. Roztok byl kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Připravený roztok byl uchováván při teplotě 4°C [43].

3.2.9 Příprava 80% ethanolu

1,6 ml 96% ethanolu bylo smícháno s 0,32 ml destilované vody a roztok byl skladován při -20°C.

3.2.10 Příprava PCR směsi

PCR směs pro jeden vzorek byla připravena smícháním následujících PCR komponent v množství uvedeném v tabulce 1.

Tabulka 1: PCR komponenty pro přípravu PCR směsi.

PCR komponenty	Objem [μ l]
sterilní voda	128,7
pufř	15
dNTP mix	3
primer ITS1	0,6
primer ITS4	0,6

K celkovému množství 147,9 μ l připravené směsi bylo přidáno 1,5 μ l templátové DNA a 0,6 μ l termostabilní Taq polymerázy. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem, ale místo templátové DNA bylo k reakční směsi přidáno 1,5 μ l sterilní vody.

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Izolace čistých kultur kvasinek

Vzorky kvasicích moštů byly odebírány od 23. 10. 2013 do 8. 11. 2013 v průběhu kvašení. Tyto vzorky byly sterilně zfiltrány. Mikrobiologický filtrační papír s odfiltrovanou biomasou byl vždy přesunut na sladidové živné médium s antibiotikem a kyselinou propionovou do Petriho misky. Takto naočkované Petriho misky byly ponechány několik dní v termostatu při 26°C.

Z namnožených smíšených kultur z moštů byly izolovány čisté kultury opakovaným zředováním Kochovou zředovací metodou a křížovými roztěry. Naočkované Petriho misky byly vždy ponechány v termostatu několik dní při teplotě 26°C kvůli dobrému namnožení kvasinkových kultur. Pro první a druhé ředění bylo použito sladidové živné médium s antibiotikem a kyselinou propionovou pro vyloučení nežádoucích plísní a bakterií. Pro další zředování a množení bylo použito médium bez antibiotika a kyseliny propionové. Proces ředění s křížovým roztěrem a následným namnožením oddělených kultur byl opakován pětkrát až šestkrát. Získané čisté kultury byly zkontrolovány v mikroskopu a byly vyloučeny získané bakteriální kolonie.

3.3.2 Izolace DNA

Izolace kvasinkové DNA byla provedena použitím komerčního setu Ultra CleanTM Microbial DNA Isolation Kit podle příloženého návodu k použití.

Do rozbíjecí mikrozkušavky byl pipetován rozbíjecí pufr v objemu 300 µl, ve kterém byly poté rozsuspendovány dvě očkovací očka kvasinkové kultury. K této směsi bylo pipetováno 50 µl roztoku MD1. Mikrozkušavky byly vloženy v horizontální poloze do adaptéru vortexu a 10 minut vortexovány při maximální rychlosti. Poté byla směs v mikrozkušavkách centrifugována 1 minutu při 10000 otáčkách a teplotě 4°C (všechny další centrifugace byly prováděny za stejných podmínek). Přibližně 350 µl supernatantu bylo přeneseno do čisté mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 100 µl roztoku MD2. Tato směs byla krátce promíchána na vortexu a inkubována 5 minut při teplotě 4°C. Poté byla směs centrifugována a získaný supernatant (přibližně 450 µl) byl opět přenesen do čisté mikrozkušavky a k němu bylo přidáno 900 µl roztoku MD3 a směs byla krátce zortexována. 700 µl připravené směsi bylo pipetováno na kolonku a centrifugováno. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a na kolonku byl pipetován zbytek směsi a opět zcentrifugováno. Přefiltrovaný roztok byl opět odstraněn a na tutéž kolonku bylo přidáno 300 µl roztoku MD4 a kolonka byla centrifugována. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a kolonka ještě jednou centrifugována. Kolonka byla poté opatrně přenesena do čisté mikrozkušavky a do středu bílé membrány kolonky bylo pipetováno 50 µl roztoku MD5 a zcentrifugováno. Kolonka byla odstraněna a roztok DNA v mikrozkušavce byl pro další použití uchován při – 20°C.

3.3.3 PCR

Z připravené PCR směsi bylo pipetováno 147,9 µl (příprava viz kapitola 3.2.10) do mikrozkušavky Eppendorf o objemu 0,5 ml a k tomuto množství bylo přidáno 1,5 µl izolované DNA a 0,6 µl *Taq* polymerázy. Směs byla mírně zortexována a vložena do termocykléru. V termocykléru byla templátová DNA namnožena polymerázovou řetězovou reakcí podle teplotního a časového profilu uvedeného v tabulce 2. K amplifikaci v oblasti 5,8S-ITS rDNA byly použity primery ITS1 a ITS4. Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v tabulce 3 [25]. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem, ale místo templátové DNA bylo k reakční směsi přidáno 1,5 µl sterilní vody.

Tabulka 2: Teplotní a časový profil PCR.

Jednotlivé kroky		Teplota [°C]	Čas [min]
Počáteční denaturace		94	4
25 cyklů	denaturace	94	1
	připojení primerů	48	0,5
	polymerace	72	1
Elongace		72	10

Tabulka 3: Použité primery a jejich sekvence.

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

3.3.4 Přečištění PCR produktu

PCR produkt je nutné před restriční analýzou přečistit následujícím způsobem. 20 μ l amplifikované DNA bylo smícháno s 2 μ l octanového pufru. Směs byla krátce zvortexována a ke směsi bylo přidáno 60 μ l 96% ethanolu, který byl vychlazen na teplotu -20°C . Tato směs se poté centrifugovala 30 minut při 4°C a 14000 otáčkách. Supernatant byl dekantován a přebytečný roztok byl slit. K supernatantu bylo do mikrozkušavky pipetováno 60 μ l 80% roztoku ethanolu a obsah byl opět centrifugován při stejných podmínkách. Supernatant byl opět dekantován a zbytek ethanolu v mikrozkušavkách byl vysušen v exsikátoru po dobu 30 minut.

3.3.5 Restriční analýza

K přečištěné DNA bylo pipetováno 13,4 μ l sterilní vody, 1,5 μ l pufru a 0,1 μ l restričního enzymu. U enzymu *MseI* byla reakční směs namíchána z 12,4 μ l sterilní vody, 1,5 μ l pufru, 1 μ l BSA a 0,1 μ l restričního enzymu. Použitá množství jednotlivých složek byla zvolena na základě doporučení od výrobců a předchozích zkušeností. Připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 16 hodin a na závěr byla teplota zvýšena na teplotu denaturace enzymu na 20 minut. Vlastnosti jednotlivých restričních endonukleáz, které byly pro taxonomické zařazení kvasinek použity, jsou uvedeny v tabulce 4. Restriční fragmenty byly poté podrobeny elektroforetické detekci.

Tabulka 4: Vlastnosti použitých restričních endonukleáz.

Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo na sekvenci DNA 5' \rightarrow 3' 3' \leftarrow 5'	t_{inkubace} [$^{\circ}\text{C}$] 16 hodin	$t_{\text{inaktivace}}$ [$^{\circ}\text{C}$] 20 minut
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	GG↓CC CC↑GG	37	80
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	C↓ATC CTA↑G	37	80
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCG↓C C↑GCG	37	80
<i>MseI</i>	<i>Micrococcus species</i>	T↓TAA AAT↑T	37	65

3.3.6 Elektroforetická detekce PCR produktů a restričních fragmentů

PCR produkty i restriční fragmenty byly detekovány pomocí horizontální elektroforézy na 2% agarózovém gelu. Podle počtu analyzovaných vzorků byly použity různé velikosti elektroforetických van. Gel na velkou vanu (50 jamek) byl připraven v objemu 100 ml, gel na střední vanu (20 jamek) v objemu 60 ml a na malou vanu (14 jamek) v objemu 40 ml. Ke gelu byl přidán ethidium bromid v objemu odpovídajícím 1/10000 objemu gelu.

Vzorky byly na gel nanášeny tak, že byl smíchán 1 μ l nanášecího pufru s 5 μ l vzorku a 5 μ l této směsi bylo pipetováno do jamky na gelu. Negativní kontrola u PCR byla nanášena stejným způsobem. Pozitivní kontrola k restrikční analýze byla provedena tak, že byl nanášen PCR produkt shodující se s délkou amplikonu, který byl pro restrikční analýzu použit. Do okrajových jamek na gelu byl nanášen délkový standard 100 bp pro detekci PCR produktů v objemu 3 μ l. Pro detekci restrikčních fragmentů byl použit délkový standard 100 bp v uvedeném množství i délkový standard 20 bp v objemu 6 μ l.

Dělení fragmentů probíhalo ve velké elektroforetické vaně při konstantním napětí 60 V po dobu 3 hodin. Ve střední vaně probíhala detekce při konstantním napětí 55 V 3 hodiny a v malé vaně při konstantním napětí 55 V po dobu 2,5 hodin.

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do transluminátoru a pod UV světlem byl gel vyfotografován nainstalovanou kamerou a snímek byl uložen do počítače pro pozdější zpracování.

3.3.7 Zpracování výsledků v programu BioNumerics

V programu BioNumerics byly na základě UPGMA (unweighted pair-group average) shlukové analýzy vytvořeny dendrogramy genetické podobnosti identifikovaných kvasinek. Klastrová analýza neboli analýza shluků patří mezi metody, které se zabývají rozdělením většího množství proměnných do tříd čili shluků podle jejich podobnosti. V biologii se využívá k taxonomickému zařazení organismů, v medicíně analýza shluků identifikuje nemoci a jejich stádia. Soubor dat je rozdělen na shluky vždy pouze s ohledem na určité znaky. V programu BioNumerics se jedná o velikosti označených fragmentů na elektroforetických gelech.

V případech, kdy porovnávané objekty mají hodnocené znaky nemetrického charakteru, využívá klastrová analýza koeficienty podobnosti. Při hodnocení genetické podobnosti identifikovaných kvasinek byl využit Jaccardův koeficient:

$$S_J = \frac{a}{a+b+c+d}, \quad (1)$$

kde a, b, c, d představují počty shodných znaků.

V programu BioNumerics se hodnotí genetická podobnost na základě metody UPGMA klastrové analýzy, což je nejjednodušší metoda, jak získat fylogenetické stromy. Metoda UPGMA neboli metoda průměrné vzdálenosti bere za vzdálenost mezi dvěma shluky průměr vzdálenosti mezi všemi páry objektů těchto shluků. Výsledkem je, že taxony, které jsou si nejvíc podobné, budou mít mezi sebou nejkratší vzdálenost. Tímto vzniká grafické zpracování hierarchicky uspořádaných shluků ve formě dendrogramů [44, 45, 46].

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Identifikace kvasinek izolovaných z vína

Cílem práce bylo identifikovat a taxonomicky zařadit kvasinky izolované z bílého vína odrůdy Veltlínské zelené a sledovat vliv autochtonní kvasinky na víno v průběhu kvašení. Sledované víno pocházelo z vinařství OENOGALA, přičemž hrozny použité na jeho výrobu byly vypěstovány u obce Kobylí na jižní Moravě a byly sklizeny dne 19. 10. 2013. Ve vinařství OENOGALA byla v předchozích letech izolována autochtonní kvasinka, kterou byl připravený mošt Veltlínského zeleného zaočkován. Tato kvasinka byla taxonomicky zařazena, jedná se o *Saccharomyces cerevisiae*. Její vlastnosti a schopnost kvašení vinného moštu však před touto studií ještě nebyly sledovány.

4.1.1 Kultivace kvasinkových kultur

Vzorky moštů pro izolaci a následnou identifikaci všech přítomných kvasinek byly odebírány do sterilních lahví o objemu 500 ml v průběhu kvašení od zakvašení dne 23. 10. 2013 do 8. 11. 2013. Dny, kdy byly jednotlivé odběry provedeny, jsou uvedeny v tabulce 5. Experiment tedy sledoval přítomnost kvasinek ve víně v kvasném procesu po dobu 17 dní. Kvašení probíhalo v objemu 600 l při teplotě v rozmezí 17°C až 21°C. Odebírané vzorky byly sterilně přefiltrovány přes mikrobiologický filtr a přefiltrované mošty byly uchovány v mrazničce při -20°C pro chemické analýzy. Odfiltrované směsné kultury byly kultivovány v Petriho miskách na sladidlovém živném médium s antibiotikem a kyselinou propionovou v termostatu při 26°C několik dní. Z namnožených směsných kultur byly získány čisté kultury kvasinek postupem popsáným v kapitole 3.1.1.

Tabulka 5: Data odběrů vzorků.

Odběr	Datum odběru
naočkování	23. 10. 2013
1. odběr	24. 10. 2013
2. odběr	25. 10. 2013
3. odběr	29. 10. 2013
4. odběr	30. 10. 2013
5. odběr	1. 11. 2013
6. odběr	4. 11. 2013
7. odběr	6. 11. 2013
8. odběr	8. 11. 2013

4.1.2 Izolace DNA

Pro izolaci DNA z přečištěných kultur kvasinek byl použit komerční set CleanTM Microbial DNA Isolation Kit a izolace DNA probíhala podle přiloženého návodu, který byl popsán v kapitole 3.3.2. Koncentrace vyizolované DNA byla průměrně 10 – 100 ng/μl. Pro další použití byla izolovaná DNA uchována v mrazničce při teplotě -20°C.

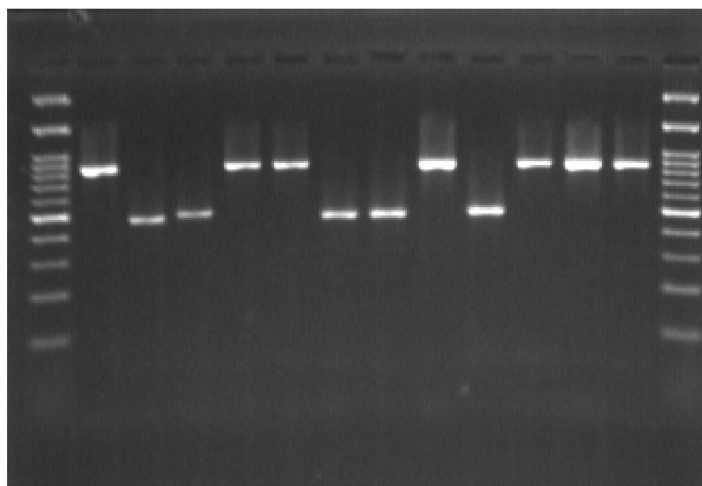
4.1.3 Amplifikace izolované DNA pomocí PCR

Izolovaná DNA z čistých kvasinkových kultur byla amplifikována pomocí PCR podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3 za použití nspecifických primerů ITS1 a ITS4. PCR produkty byly elektroforeticky rozděleny na 2% agarózovém gelu. Vyhodnocením amplifikovaných fragmentů 5,8S-ITS byly nalezeny tři skupiny o velikostech 880 bp, 480 bp a 500 bp. Pro dobré oddělení jednotlivých fragmentů i délkových standardů byly dodržovány podmínky elektroforetické detekce uvedené v kapitole 3.3.6. Porovnáním s databází typových kvasinek bylo zjištěno, že u fragmentů délky 880 bp by se mohlo jednat o kvasinky rodu *Saccharomyces* a u fragmentů délky 480 bp a 500 bp by se mohlo jednat o kvasinky rodu *Pichia*. Délky amplifikovaných fragmentů jednotlivých vzorků jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Velikost amplikonů oblastí 5,8S-ITS jednotlivých kvasinek izolovaných z vína.

Pracovní označení	Odběr	Velikost PCR produktu [bp]
22	7	880
28	4	880
24	6	880
46	1	880
49	8	880
50	4	880
53	4	880
55	4	880
56	3	880
57	7	880
19	4	880
47	2	480
51	3	480
52	4	480
23	2	480
21	6	500
30	5	500
25	5	500
29	4	500
54	6	500
20	7	500
26	1	500
27	1	500
48	3	500

S₁₀₀ 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 S₁₀₀



Obrázek 10: Ukázka elektroforeogramu PCR produktů získaný amplifikací 5,8S-ITS oblastí kvasinek izolovaných z vína. S₁₀₀ – délkový standard 100 bp, čísla 46-57 jsou pracovní označení jednotlivých vzorků.

4.1.4 Restrikční analýza (RFLP-PCR)

Pro přesnější taxonomické zařazení byly naamplifikované úseky DNA jednotlivých izolovaných kvasinek podrobeny restrikční analýze. Pro specifikaci kvasinek izolovaných z vína byly použity 3 restrikční endonukleázy – *Hae*III, *Hinf*I a *Hha*I. PCR produkty byly nejprve přečištěny ethanolem kvůli odstranění nežádoucích složek a poté byla provedena restrikční analýza podle postupu, který je uveden v kapitole 3.3.5. Štěpení úseků DNA na specifické fragmenty probíhalo v termocykleru po dobu 16 hodin při teplotě 37°C, která je vhodná pro všechny typy použitých restrikčních enzymů.

4.1.4.1 Restrikční endonukleáza *Hae*III

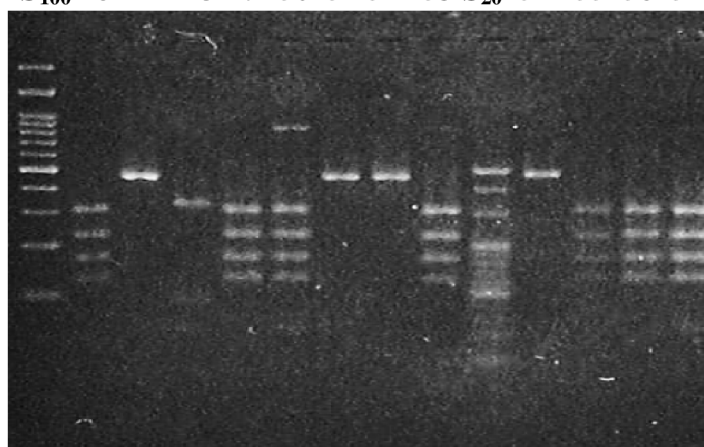
Restrikční endonukleáza *Hae*III byla prvním enzymem, kterým bylo provedeno štěpení PCR produktů. Enzym *Hae*III rozpoznává a štěpí místo 5' GG↓CC 3' DNA. Vzorky po restrikčním štěpení byly elektroforeticky detekovány a zjištěné velikosti fragmentů jednotlivých vzorků po digesci enzymem *Hae*III jsou uvedeny v tabulce 7. Ukázka gelu s rozdělenými restrikčními fragmenty tohoto enzymu je na obrázku 11.

Restrikční analýzou enzymem *Hae*III byly izolované vzorky kvasinek rozděleny do tří skupin. První skupinou jsou vzorky s délkou PCR produktů 880 bp, jejichž restrikční fragmenty po naštípání enzymem *Hae*III mají délky 310 bp, 240 bp, 170 bp a 130 bp. Další skupinou jsou vzorky, které měly délku PCR produktů 500 bp a jejich restrikční fragmenty mají délky 350 bp, 80 bp a 50 bp. Třetí skupinou jsou vzorky s délkou PCR produktů 480 bp a 500 bp, které nemají rozpoznávací místo pro restrikční endonukleázu *Hae*III, takže nebyly rozděleny.

Tabulka 7: Velikost restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných z vína restrikční endonukleázou HaeIII.

Pracovní označení	Odběr	Velikost PCR produktu [bp]	Velikost restrikčních fragmentů [bp]
22	7	880	310+240+170+130
28	4	880	310+240+170+130
24	6	880	310+240+170+130
46	1	880	310+240+170+130
49	8	880	310+240+170+130
50	4	880	310+240+170+130
53	4	880	310+240+170+130
55	4	880	310+240+170+130
56	3	880	310+240+170+130
57	7	880	310+240+170+130
19	4	880	310+240+170+130
47	2	480	neštěpeno
51	3	480	neštěpeno
52	4	480	neštěpeno
23	2	480	neštěpeno
21	6	500	neštěpeno
30	5	500	neštěpeno
25	5	500	neštěpeno
29	4	500	neštěpeno
54	6	500	neštěpeno
20	7	500	neštěpeno
26	1	500	320+80+50
27	1	500	320+80+50
48	3	500	320+80+50

S₁₀₀ 46 47 48 49 50 51 52 53 S₂₀ 54 55 56 57

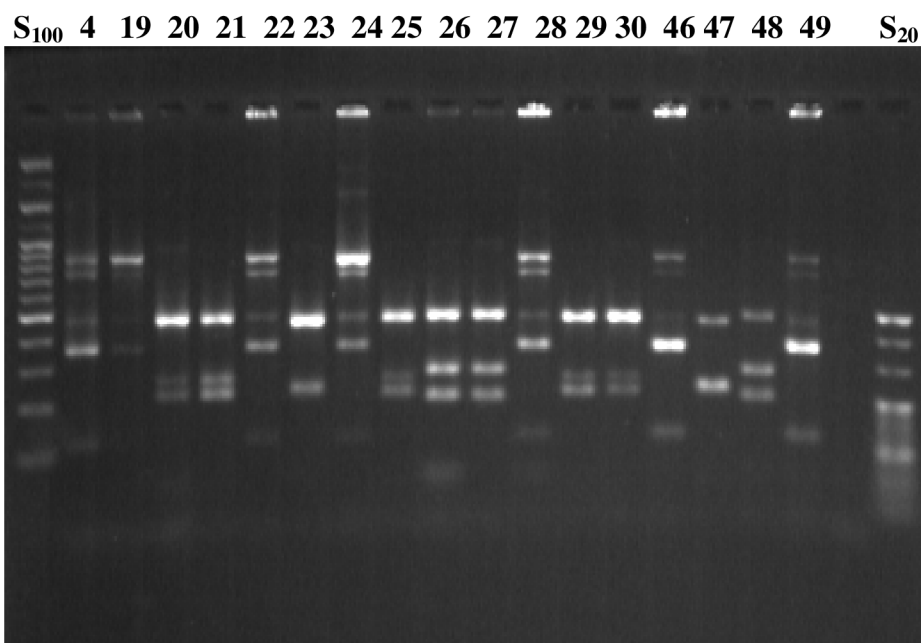


Obrázek 11: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných z vína pomocí restrikční endonukleázy HaeIII.

4.1.4.2 Restrikční endonukleáza *Hinf*I

Dalším enzymem, který byl použit pro restrikční analýzu, byla restrikční endonukleáza *Hinf*I. Enzym *Hinf*I rozpoznává a štěpí místo 5' C↓ATC 3' DNA. Zjištěné velikosti fragmentů jednotlivých vzorků po štěpení enzymem *Hinf*I jsou uvedeny v tabulce 8. Ukázka gelu s rozdělenými restrikčními fragmenty tohoto enzymu je na obrázku 12.

Restrikční analýzou pomocí restrikční endonukleázy *Hinf*I byly kvasinky izolované z vína v průběhu kvašení rozděleny do čtyř skupin. První skupinou jsou vzorky s délkou amplifikovaného úseku DNA 880 bp, který se u jednotlivých vzorků pomocí enzymu *Hinf*I rozštípal na restrikční fragmenty o délkách 380 bp a 120 bp. Další skupinou jsou izoláty s délkou PCR produktů 500 bp, které se pomocí enzymu *Hae*III štěpily a digescí enzymem *Hinf*I byly získány fragmenty o délkách 290 bp a 210 bp. Poslední dvě skupiny tvoří vzorky, které nebyly pomocí enzymu *Hae*III rozštěpeny. Restrikční endonukleáza *Hinf*I byla schopna z PCR produktů těchto vzorků vytvořit specifické fragmenty o délkách 250 bp v jedné skupině vzorků a 280 bp a 240 bp ve skupině poslední. Ze získaných výsledků tedy můžeme zhodnotit, že restrikční endonukleáza *Hinf*I poskytla specifičtější rozdělení daných kvasinek rodů *Saccharomyces* a *Pichia* než restrikční endonukleáza *Hae*III.



Obrázek 12: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných z vína pomocí restrikční endonukleázy *Hinf*I.

Tabulka 8: Velikost restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných z vína restrikční endonukleázou HinfI.

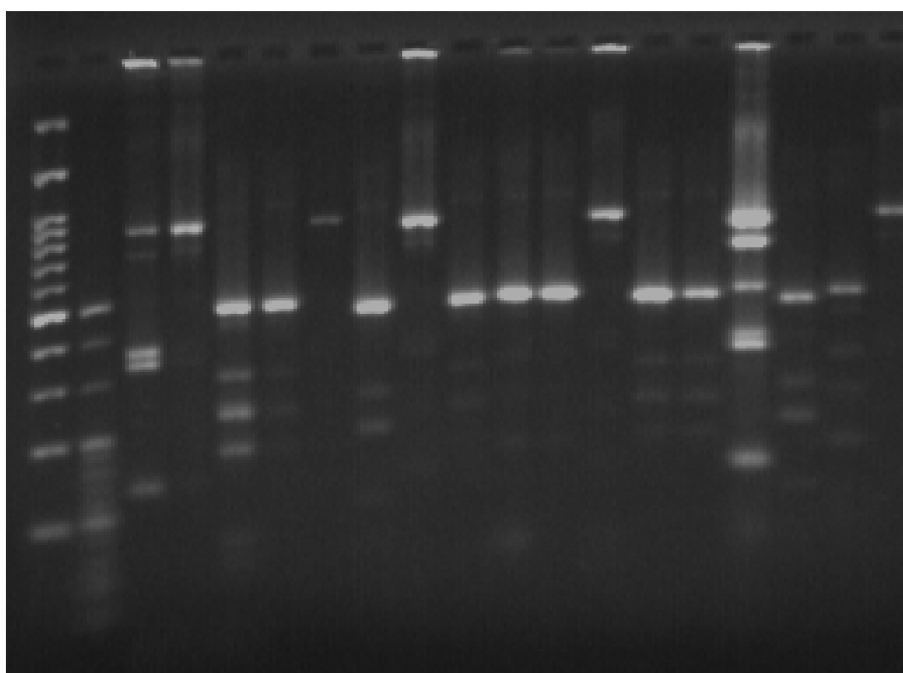
Pracovní označení	Odběr	Velikost PCR produktu [bp]	Velikost restrikčních fragmentů [bp]
22	7	880	380+120
28	4	880	380+120
24	6	880	380+120
46	1	880	380+120
49	8	880	380+120
50	4	880	380+120
53	4	880	380+120
55	4	880	380+120
56	3	880	380+120
57	7	880	380+120
19	4	880	380+120
47	2	480	240
51	3	480	240
52	4	480	240
23	2	480	240
21	6	500	280+240
30	5	500	280+240
25	5	500	280+240
29	4	500	280+240
54	6	500	280+240
20	7	500	280+240
26	1	500	290+210
27	1	500	290+210
48	3	500	290+210

4.1.4.3 Restrikční endonukleáza *HhaI*

Poslední experiment pro identifikaci a taxonomické zařazení kvasinek izolovaných ze studovaného vína byl proveden s restrikčním enzymem *HhaI*. Tato restrikční endonukleáza štěpí DNA v místě 5' GCG↓C 3'. Po restrikční analýze proběhla elektroforetická detekce a výsledné délky fragmentů jsou zaznamenány v tabulce 9. Ukázka gelu s rozdělenými restrikčními fragmenty je na obrázku 13.

Restrikční analýzou pomocí enzymu *HhaI* byly izolované kvasinky rozděleny do pěti skupin. Vzorky s PCR produkty o délce fragmentu 880 bp byly pomocí restrikční analýzy enzymem *HhaI* rozděleny na restrikční fragmenty o délkách 380 bp, 350 bp a 140 bp. U skupiny vzorků s délkou PCR produktu 500 bp, které se pomocí enzymu *HaeIII* štěpily, došlo v tomto experimentu k rozdílnému štěpení. U vzorků 26 a 27 vznikly restrikční fragmenty o délkách 220 bp a 90 bp, kdežto u vzorku 48 byla amplifikovaná DNA štěpena na tři fragmenty o délkách 220 bp, 130 bp a 90 bp. U skupiny vzorků izolovaných kvasinek s délkou PCR produktu 480 bp došlo k naštípání restrikční endonukleázou *HhaI* na fragmenty o délkách 220 bp, 170 bp a 90 bp. Poslední skupinou jsou vzorky s původní délkou amplifikovaná DNA 500 bp, které se pomocí enzymu *HaeIII* neštěpily. Zde došlo k naštípání na fragmenty o délkách 220 bp a 180 bp.

S₁₀₀ S₂₀ 4 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 46 47 48 49



Obrázek 13: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných z vína pomocí restrikční endonukleázy *HhaI*.

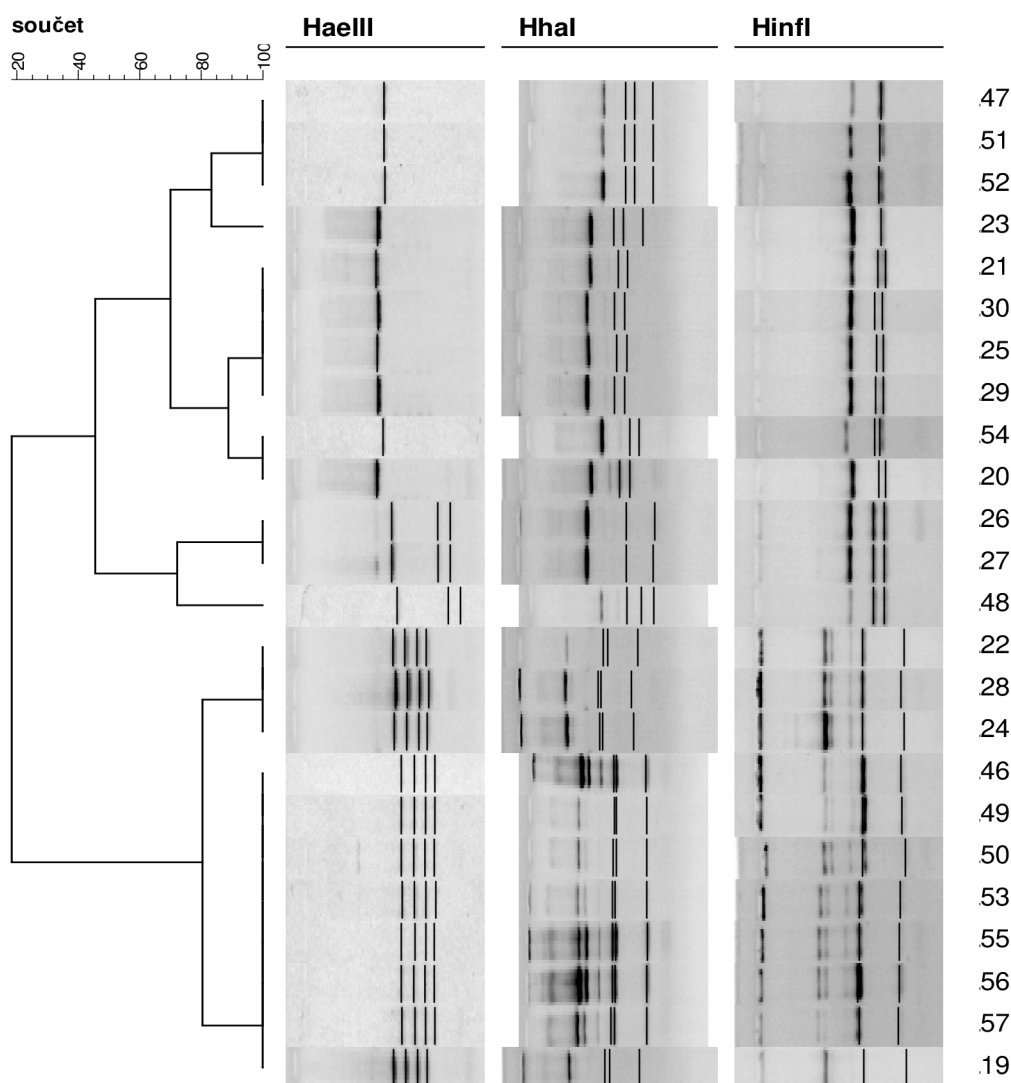
Tabulka 9: Velikost restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů kvasinek izolovaných z vína restrikční endonukleázou HhaI.

Pracovní označení	Odběr	Velikost PCR produktu [bp]	Velikost restrikčních fragmentů [bp]
22	7	880	380+350+140
28	4	880	380+350+140
24	6	880	380+350+140
46	1	880	380+350+140
49	8	880	380+350+140
50	4	880	380+350+140
53	4	880	380+350+140
55	4	880	380+350+140
56	3	880	380+350+140
57	7	880	380+350+140
19	4	880	380+350+140
47	2	480	220+170+90
51	3	480	220+170+90
52	4	480	220+170+90
23	2	480	220+170+90
21	6	500	220+180
30	5	500	220+180
25	5	500	220+180
29	4	500	220+180
54	6	500	220+180
20	7	500	220+180
26	1	500	220+90
27	1	500	220+90
48	3	500	220+130+90

4.1.5 Dendrogram kvasinek izolovaných z vína

Elektroforeticky rozdělené fragmenty byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu BioNumerics. Tento program byl popsán v kapitole 3.3.7. Pomocí BioNumericsu byl z naměřených dat na základě UPGMA klastrové analýzy sestaven dendrogram pro izolované kvasinky, který je znázorněn na obrázku 14. Cílem klastrové analýzy je nalézt v souboru dat objekty, které jsou si podobné a shromáždit je do skupin. Jako kritérium byly zvoleny Jaccardovy koeficienty podobnosti na úrovni 4 %.

Statistickým zhodnocením výsledků získaných pomocí restriční analýzy byl získán dendrogram, který rozděluje izolované kvasinky do dvou základních skupin. Jedna skupina jsou kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kterými jako autochtonními kvasinkami byl hroznový mošt pro zahájení kvašení zaočkován. Porovnáním získaných délek fragmentů s databází bylo určeno, že druhou velkou skupinou jsou kvasinky rodu *Pichia*.



Obrázek 14: Dendrogram genetické podobnosti kvasinek izolovaných z vína sestavený na základě výsledků z restriční analýzy pro enzymy *HaeIII*, *HinfI* a *HhaI*.

Získanými výsledky se nám podařilo porovnáním s databází izolované kvasinky identifikovat na druhové úrovni na *Pichia fluxum*, *Pichia membranifaciens*. Třetí skupinu kvasinek rodu *Pichia* se provedenými experimenty a porovnáním výsledků s databází nepodařilo blíže specifikovat.

Cílem práce bylo stanovit vliv autochtonní kvasinky na průběh kvašení vína. V tabulce 10 jsou výše komentované vzorky rozděleny podle jejich přítomnosti v určitém odběru. Tímto je znázorněn profil přítomnosti kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* ve víně v průběhu kvašení.

Tabulka 10: Identifikované kvasinky přítomné ve víně v průběhu kvašení.

Odběr	Pracovní označení	Velikost PCR produktu [bp]	Název
1	26	500	<i>Pichia membranifaciens</i>
	27	500	<i>Pichia membranifaciens</i>
	46	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	23	480	<i>Pichia fluxuum</i>
	47	480	<i>Pichia fluxuum</i>
3	48	500	<i>Pichia membranifaciens</i>
	51	480	<i>Pichia fluxuum</i>
	56	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	19	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	28	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	29	500	<i>Pichia sp.</i>
	50	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	52	480	<i>Pichia fluxuum</i>
	53	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5	25	500	<i>Pichia sp.</i>
	30	500	<i>Pichia sp.</i>
6	21	500	<i>Pichia sp.</i>
	24	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	54	500	<i>Pichia sp.</i>
7	20	500	<i>Pichia sp.</i>
	22	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	57	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
8	49	880	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Ze získaných výsledků lze zhodnotit, že přítomnost kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byla zjištěna u odběrů č. 1, 3, 4, 5, 7, 8. Z odběrů č. 2 a 5 sice izolovány nebyly, ale jejich přítomnost ve víně v těchto fázích kvašení vyloučena není.

Izolací a identifikací kvasinek bylo rovněž zjištěno, že kvasinky *Pichia membranifaciens* a *Pichia fluxuum* byly přítomny na počátku kvašení a od 5. odběru se ve zkoumaném víně již nevyskytovaly. Toto zjištění lze vysvětlit tak, že v průběhu kvašení dochází ke snižování živin v podobě sacharidů za současného zvyšování množství ethanolu, takže méně odolné kvasinky začínají ve zhoršených životních podmínkách umírat.

Opačný jev byl zjištěn u druhově nespécifikovaných kvasinek *Pichia sp.* Můžeme se domnívat, že tyto kvasinky byly na počátku kvašení přítomné ve víně v malém množství, takže se je nepodařilo z odebíraných vzorků izolovat. V průběhu kvašení se jejich množství začalo zvyšovat a podařilo se je identifikovat v 5., 6. a 7. odběru. V odběru č. 8 byly izolovány pouze kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, takže lze předpokládat, že ostatní kvasinky, které byly v průběhu kvašení přítomny, již v této fázi kvašení odumřely.

4.1.6 Senzorické hodnocení vína

Předmětem sensorického hodnocení bylo víno Veltlínské zelené 2013, které bylo zakvašeno izolovaným kmenem autochtonní kvasinky GALA. Toto víno bylo porovnáno s Veltlínským zeleným 2013, které bylo zakvašeno komerční kvasinkou Laffort VL2. Víno, které podstoupilo sensorické testování, ještě nebylo vyčreáno, proběhla u něj pouze sedimentace. Sensorické hodnocení bylo zhodnoceno vinařem Alešem Galou, který má speciální mezinárodní zkoušky. Víno bylo popsáno následovně:

Víno zakvašené autochtonní kvasinkou je sytější zlatavé barvy. Protože zatím neproběhlo čiření, ale pouze sedimentace, víno ještě není jiskrné. Aroma vína je zemité, lehce kvasničné (stále leží na jemných kalech), zralostní a spíše neutrální. Předpokládá se zvýraznění aroma po jeho vyčreání a zrání. Víno je chuťově robustní s dobrou strukturou, vyvážené s dlouhou a ovocnou dochutí a má velký předpoklad pro zrání a nárůst kvality. Ve srovnání s druhou šarží vína Veltlínské zelené, kde více vyniká ovocné aroma, je struktura vína slabší. Veltlínské zelené GALA má větší předpoklad do budoucna a pro zrání v lahvi.



Obrázek 15: Sensorické hodnocení vína Veltlínské zelené 2013.

4.2 Vyhodnocení výsledků typových kvasinek

Druhou částí diplomové práce bylo rozšířit databázi o typové kvasinky dodané z CCY ze Slovenska. Celkově byly experimenty provedeny se 28 kvasinkami, jejichž seznam je uveden v kapitole 3.1.1. U těchto typových kvasinek byla provedena PCR a restriční analýza enzymy *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *MseI*. Získané délky fragmentů rozšiřují databázi a budou základem pro další studie.

4.2.1 Příprava vzorků typových kvasinek a izolace DNA

Typové kvasinky byly dodány ve formě šikmých agarů, které nebyly zality parafínovým olejem. Z šikmých agarů bylo odebíráno očkovací kličkou malé množství kultur a rozetřeno na Petriho miskách na sladidlovém živném médiu. Takto připravené Petriho misky byly ponechány v termostatu při teplotě 26°C pro namnožení kvasinkových kultur. Z namnožených kultur byla zaočkována sladidlová živná média ve formě šikmých agarů. Po kultivaci, která probíhala několik dní při teplotě 26°C, byly šikmé agary zality sterilním parafínovým olejem. Takto připravené kvasinkové kultury na dlouhodobější uchování byly uloženy v chladicím boxu, kde je udržována konstantní teplota 2°C.

Z namnožených kultur byla izolována DNA pomocí komerčního setu CleanTM Microbial DNA Isolation Kit podle příloženého návodu, který byl popsán v kapitole 3.3.2. Izolovaná DNA byla pro další použití a uchování uložena v mrazničce při teplotě -20°C.

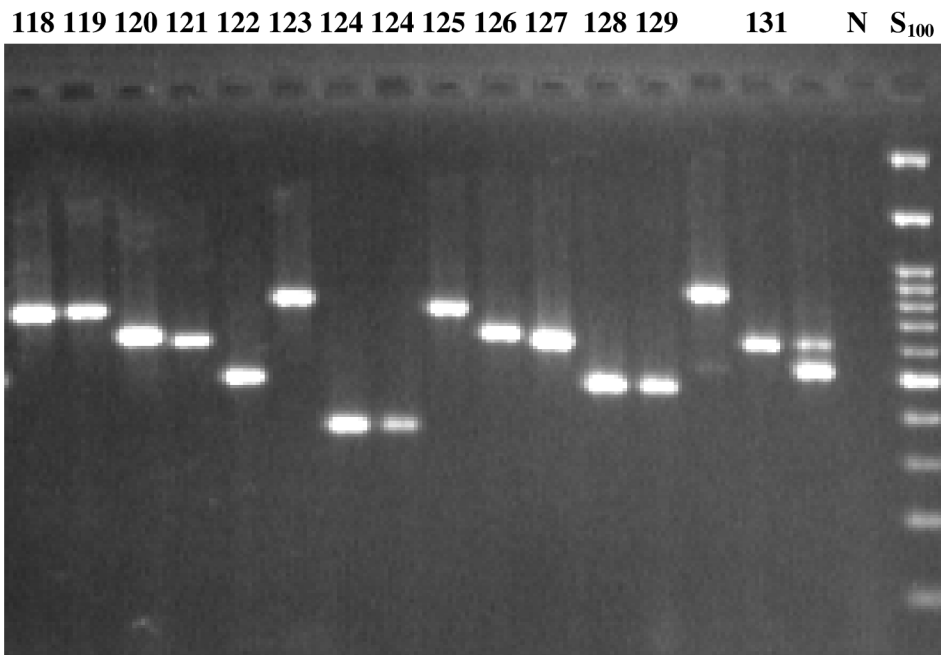
4.2.2 Amplifikace izolované DNA pomocí PCR

U vzorků typových kvasinek byla u izolované DNA provedena amplifikace úseků 5,8S-ITS označených nespecifickými primery ITS1 a ITS4. Polymerázová řetězová reakce probíhala v teplotním režimu popsaném v kapitole 3.3.3. Amplifikované úseky byly elektroforeticky detekovány za stejných podmínek jako při identifikaci kvasinek izolovaných z vína. Zjištěné délky PCR produktů jsou uvedeny v tabulce 11. Ukázka gelu s rozdělenými fragmenty je uvedena na obrázku 16.

Amplifikací úseků vyznačených primery ITS1 a ITS4 vznikly různé délky těchto amplikonů, které byly elektroforeticky detekovány. Poté byla zjištěna jejich délka srovnáním se standardy délek. Bylo nalezeno několik skupin různých délek amplikonů. Rody kvasinek *Wickerhamomyces*, *Sporobolomyces*, *Debaryomyces* a *Meyerozyma* měli PCR produkt o délce 650 bp. U rodu kvasinek *Hanseniaspora* byly nalezeny amplikony o délce 750 bp a u rodu *Zygosaccharomyces* o délce 790 bp. Amplifikované fragmenty u rodu kvasinek *Pichia* měli délku 450 bp, 500 bp a 530 bp. Další testované typové kvasinky byly rodu *Yarrowia* s délkou PCR produktů 380 bp a *Issatchenkia* s délkou amplikonů 450 bp.

Tabulka 11: Délky fragmentů PCR produktů získaných amplifikací 5,8S-ITS oblastí typových kvasinek.

Název	Pracovní označení	Číslo CCY	Délky PCR produktu [bp]
<i>Debaryomyces hansenii</i>	120	41-6-17	650
<i>Debaryomyces hansenii</i>	126	41-6-15	650
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	148	39-23-6	650
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	130	21-22-3	520
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	132	21-22-1	520
<i>Zygosaccharomyces balilii</i>	154	35-6-6	790
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	144	38-1-35	650
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	147	38-1-16	650
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	127	38-1-38	650
<i>Sporobolomyces roseus</i>	121	19-6-16	650
<i>Sporobolomyces roseus</i>	131	19-6-10	650
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	119	25-6-33	750
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	125	46-3-17	750
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	123	41-24-2	800
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	118	25-9-3	750
<i>Pichia fermentans</i>	145	39-4-6	450
<i>Pichia fermentans</i>	149	39-4-7	450
<i>Pichia fermentans</i>	150	39-4-8	450
<i>Pichia membranifaciens</i>	122	39-1-21	500
<i>Pichia kudriavzevii</i>	135	29-5-5	530
<i>Pichia kudriavzevii</i>	136	29-9-42	530
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	151	29-55-3	450
<i>Pichia scaptomyzae</i>	153	29-93-4	530
<i>Pichia manshurica</i>	129	39-4-12	500
<i>Pichia sporocuriosa</i>	134	39-1-26	450
<i>Pichia manshurica</i>	128	39-63-1	500
<i>Yarrowia lipolytica</i>	124	29-26-34	380
<i>Yarrowia lipolytica</i>	139	29-26-21	380



Obrázek 16: Ukázka elektroforeogramu PCR produktů získaný amplifikací 5.8S-ITS oblastí typových kvasinek. N – negativní kontrola, S₁₀₀ – délkový standard 100 bp.

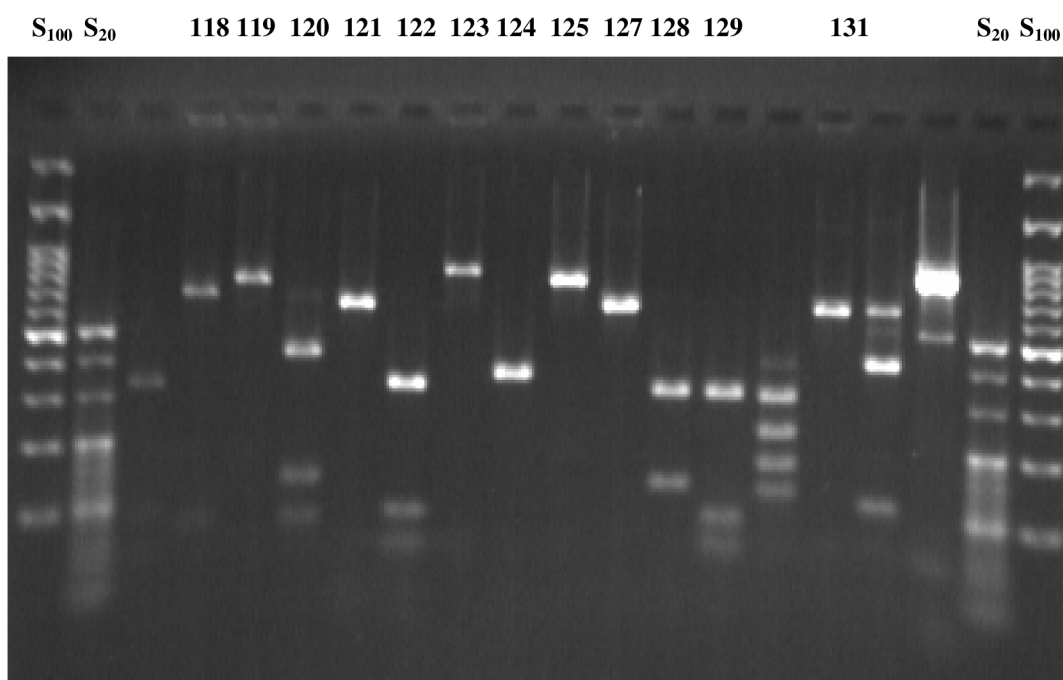
4.2.3 Restrikční analýza typových kvasinek (RFLP-PCR)

Restrikční štěpení amplifikované DNA izolované z typových kvasinek bylo provedeno s restrikčními endonukleázami *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *MseI*. Vzniklé restrikční fragmenty byly elektroforeticky rozděleny a detekovány. Délky fragmentů byly zaznamenány a nachází se v tabulkách 9, 10, 11 a 12. Byl použit jeden enzym navíc (*MseI*) než při identifikaci kvasinek izolovaných z vína kvůli přesnější charakterizaci jednotlivých typových kvasinek. Získané výsledky byly doplněny do databáze a budou sloužit pro další studie.

4.2.3.1 Restrikční endonukleáza *HaeIII*

Restrikční endonukleáza *HaeIII* byla prvním enzymem, kterým bylo provedeno štěpení PCR produktů typových kvasinek. Enzym *HaeIII* rozpoznává a štěpí místo 5' GG↓CC 3' DNA. Vzorke po restrikčním štěpení byly elektroforeticky detekovány a zjištěné velikosti fragmentů jednotlivých vzorků po digesci enzymem *HaeIII* jsou uvedeny v tabulce 12. Ukázka gelu s rozdělenými restrikčními fragmenty tohoto enzymu je na obrázku 17.

Restrikční analýzou naamplifikovaných PCR produktů typových kvasinek pomocí restrikční endonukleázy *HaeIII* bylo získáno několik skupin s různými délkami restrikčních fragmentů. U některých kvasinek rodu *Wickerhamomyces*, *Sporobolomyces*, *Hanseniaspora* a *Yarrowia* nebyla nalezena štěpná místa a enzymem *HaeIII* tedy amplikony štěpeny nebyly. U ostatních testovaných kvasinek byly PCR produkty rozštěpeny na dva nebo tři fragmenty.



Obrázek 17: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů typových kvasinek pomocí restrikční endonukleázy *HaeIII*.

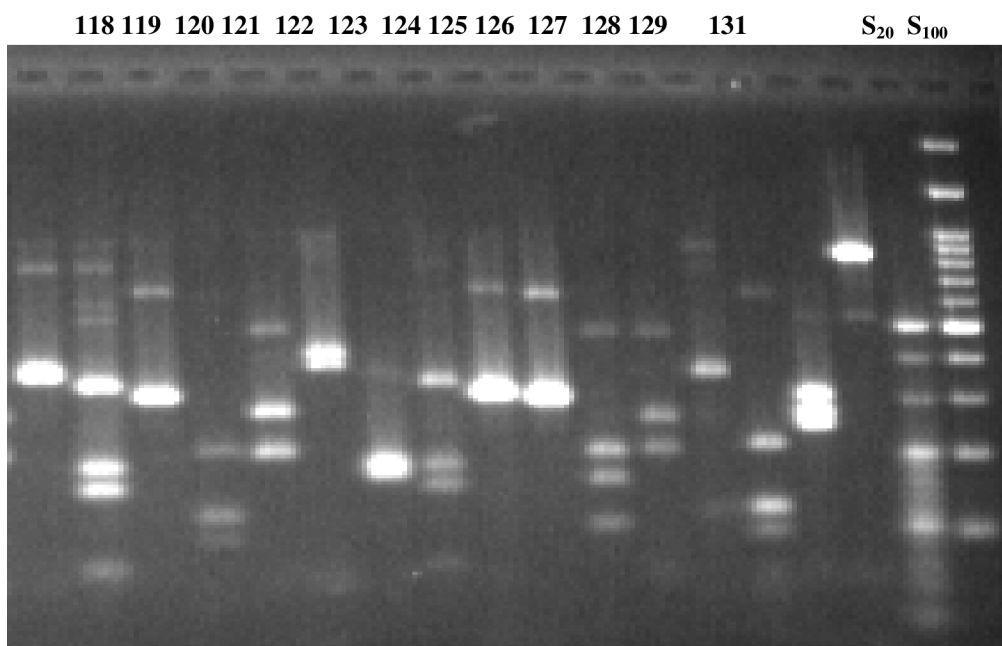
Tabulka 12: Délky restričních fragmentů získané štěpením PCR produktů restriční endonukleázou HaeIII.

Název	Pracovní označení	Délky PCR produktu [bp]	Délky restričních fragmentů [bp]
<i>Debaryomyces hansenii</i>	120	650	400+150+100
<i>Debaryomyces hansenii</i>	126	650	400+150+100
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	148	650	410+140+100
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	130	520	420+100
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	132	520	420+100
<i>Zygosaccharomyces balilii</i>	154	790	690+100
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	144	650	neštěpeno
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	147	650	neštěpeno
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	127	650	neštěpeno
<i>Sporobolomyces roseus</i>	121	650	neštěpeno
<i>Sporobolomyces roseus</i>	131	650	neštěpeno
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	119	750	neštěpeno
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	125	750	neštěpeno
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	123	800	neštěpeno
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	118	750	neštěpeno
<i>Pichia fermentans</i>	145	450	340+80+30
<i>Pichia fermentans</i>	149	450	340+80+30
<i>Pichia fermentans</i>	150	450	340+80+30
<i>Pichia membranifaciens</i>	122	500	330+90+80
<i>Pichia kudriavzevii</i>	135	530	380+100+50
<i>Pichia kudriavzevii</i>	136	530	380+100+50
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	151	450	350+100+80
<i>Pichia scaptomyzae</i>	153	530	350+100+80
<i>Pichia manshurica</i>	129	500	350+100+80
<i>Pichia sporocuriosa</i>	134	450	280+120
<i>Pichia manshurica</i>	128	500	350+150
<i>Yarrowia lipolytica</i>	124	380	neštěpeno
<i>Yarrowia lipolytica</i>	139	380	neštěpeno

4.2.3.2 Restrikční endonukleáza *Hinf*I

Dalším enzymem, který byl použit pro restrikční analýzu, byla restrikční endonukleáza *Hinf*I. Enzym *Hinf*I rozpoznává a štěpí místo 5' C↓ATC 3' DNA. Touto restrikční endonukleázou byly štěpeny všechny amplifikované produkty PCR testovaných kvasinek buď na dva shodné fragmenty nebo na dva a více fragmentů o různých délkách.

Porovnáním délek fragmentů po restrikční analýze enzymem *Hinf*I se standardy byly zjištěny délky jednotlivých fragmentů, které jsou uvedeny v tabulce 13. Ukázka gelu s rozdělenými restrikčními fragmenty tohoto enzymu je na obrázku 18.



Obrázek 18: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů typových kvasinek pomocí restrikční endonukleázy *Hinf*I.

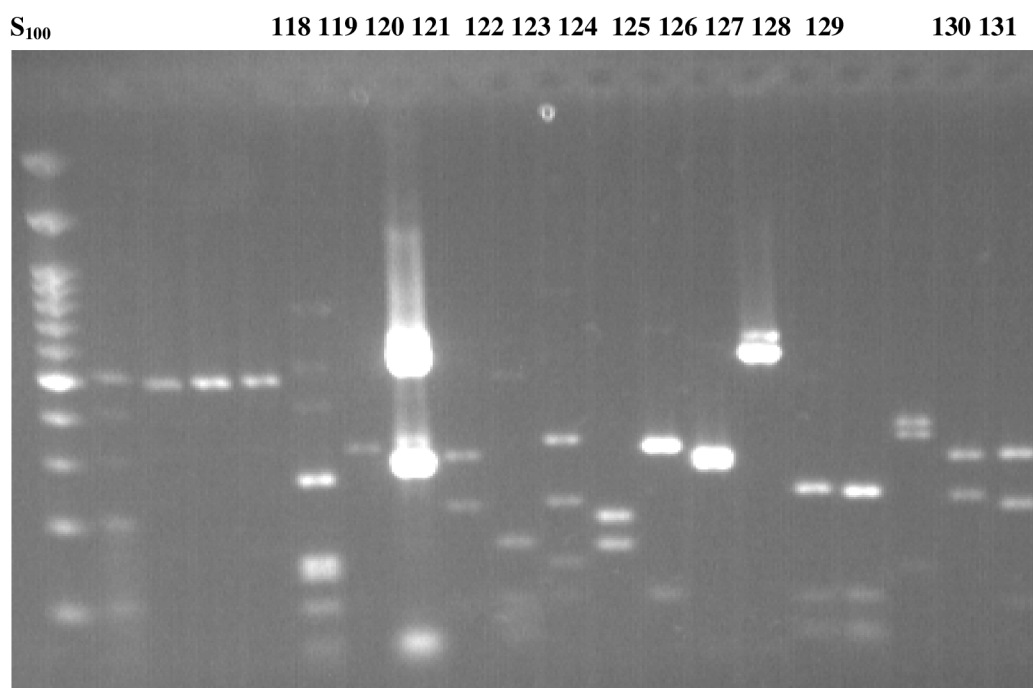
Tabulka 13: Délky restrikčních fragmentů získané štěpením PCR produktů restrikční endonukleázou *Hinf*I.

Název	Pracovní označení	Délky PCR produktu [bp]	Délky restrikčních fragmentů [bp]
<i>Debaryomyces hansenii</i>	120	650	320+320
<i>Debaryomyces hansenii</i>	126	650	320+320
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	148	650	330+300
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	130	520	270+250
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	132	520	270+250
<i>Zygosaccharomyces balilii</i>	154	790	350+230+170
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	144	650	320+320
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	147	650	320+320
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	127	650	320+320
<i>Sporobolomyces roseus</i>	121	650	210+120+90
<i>Sporobolomyces roseus</i>	131	650	210+120+90
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	119	750	350+180+150
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	125	750	350+180+150
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	123	800	410+380
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	118	750	380+380
<i>Pichia fermentans</i>	145	450	270+200
<i>Pichia fermentans</i>	149	450	270+200
<i>Pichia fermentans</i>	150	450	270+200
<i>Pichia membranifaciens</i>	122	500	290+210
<i>Pichia kudriavzevii</i>	135	530	220+140
<i>Pichia kudriavzevii</i>	136	530	220+140
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	151	450	280+120
<i>Pichia scaptomyzae</i>	153	530	240+190
<i>Pichia manshurica</i>	129	500	260+200
<i>Pichia sporocuriosa</i>	134	450	250+200
<i>Pichia manshurica</i>	128	500	200+160+100
<i>Yarrowia lipolytica</i>	124	380	190+190
<i>Yarrowia lipolytica</i>	139	380	190+190

4.2.3.3 Restrikční endonukleáza *HhaI*

Další restrikční analýza byla provedena štěpením enzymem *HhaI*. Tato restrikční endonukleáza štěpí DNA v místě 5' GCG↓C 3'. Po restrikční analýze proběhla elektroforetická detekce a výsledné délky fragmentů jsou zaznamenány v tabulce 14. Ukázka gelu s rozdělenými restrikčními fragmenty je na obrázku 19.

U vzorku 148 (*Meyerozyma guilliermondii*) nebyla nalezena restrikční místa a amplikony vytvořené PCR tedy nebyly štěpeny. U ostatních vzorků byla štěpná místa restrikční endonukleázou nalezena a PCR produkty byly štěpeny na dva, tři nebo čtyři fragmenty o různých délkách. U vzorku 118 (*Hanseniaspora guilliermondii*) byl amplikon štěpen dokonce na 5 fragmentů. Došlo zde k rozdílnému štěpení než u vzorků 119 a 125 (*Hanseniaspora uvarum*), takže můžeme identifikovat taxonomické rozdělení na druhové úrovni.



Obrázek 19: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů typových kvasinek pomocí restrikční endonukleázy *HhaI*.

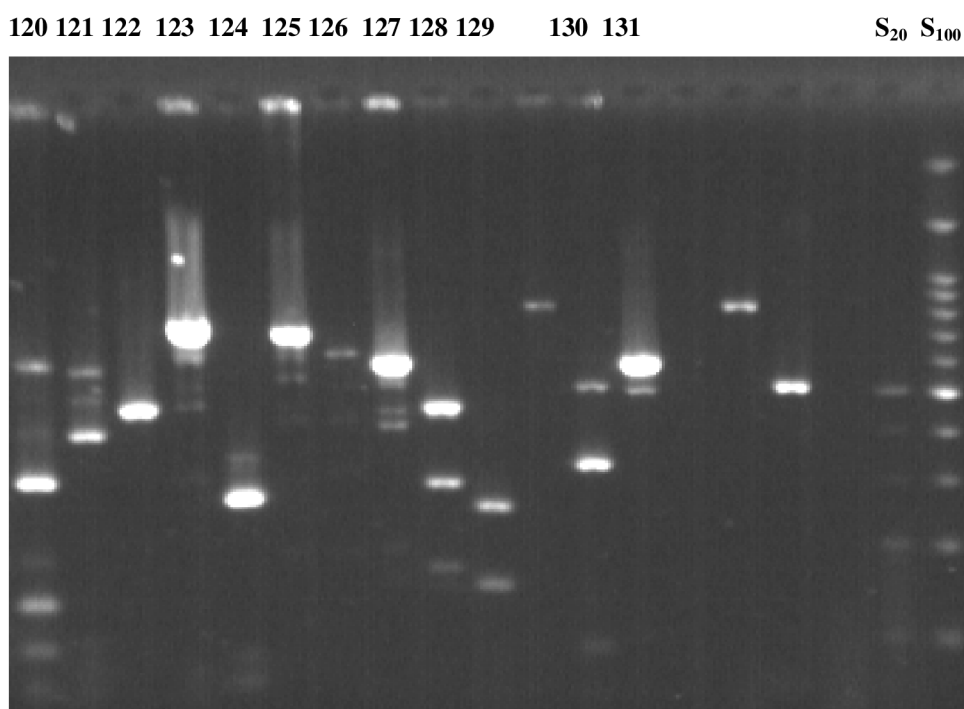
Tabulka 14: Délky restričních fragmentů získané štěpením PCR produktů restriční endonukleázou HhaI.

Název	Pracovní označení	Délky PCR produktu [bp]	Délky restričních fragmentů [bp]
<i>Debaryomyces hansenii</i>	120	650	300+300+50
<i>Debaryomyces hansenii</i>	126	650	300+300+50
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	148	650	neštěpeno
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	130	520	310+240
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	132	520	310+240
<i>Zygosaccharomyces balilii</i>	154	790	320+270
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	144	650	520+60
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	147	650	520+60
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	127	650	600+50
<i>Sporobolomyces roseus</i>	121	650	320+230+100
<i>Sporobolomyces roseus</i>	131	650	320+230+100
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	119	750	320 +310+120
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	125	750	320+310+120
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	123	800	350+250+150
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	118	750	260+130+120+90+50
<i>Pichia fermentans</i>	145	450	170+100+80
<i>Pichia fermentans</i>	149	450	170+100+80
<i>Pichia fermentans</i>	150	450	170+100+80
<i>Pichia membranifaciens</i>	122	500	180+120+80
<i>Pichia kudriavzevii</i>	135	530	220+190+80+70
<i>Pichia kudriavzevii</i>	136	530	220+190+80+70
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	151	450	240+210+90
<i>Pichia scaptomyzae</i>	153	530	400+300+230+170
<i>Pichia manshurica</i>	129	500	250+120+80
<i>Pichia sporocuriosa</i>	134	450	140+100
<i>Pichia manshurica</i>	128	500	250+120+80
<i>Yarrowia lipolytica</i>	124	380	220+180
<i>Yarrowia lipolytica</i>	139	380	220+180

4.2.3.4 Restrikční endonukleáza *MseI*

Poslední experiment restrikčního štěpení byl proveden s enzymem *MseI*. Tato restrikční endonukleáza rozpoznává a štěpí místo 5' T↓TAA 3' v amplifikovaném úseku DNA. Získané specifické fragmenty byly elektroforeticky děleny a identifikované fragmenty jsou uvedeny v tabulce 15. Ukázka gelu elektroforetické identifikace je uvedena na obrázku 20.

Vzorky 145, 149 a 150 (*Pichia fermentas*) a 122 (*Pichia membranifaciens*) nebyly touto restrikční endonukleázou štěpeny. U několika dalších vzorků nejpočetněji zastoupené skupiny analyzovaných kvasinek rodu *Pichia* byly nalezeny fragmenty o několik desítek párů bází kratší, než původní PCR produkty. Tyto výsledky mohou být vysvětleny tak, že některé fragmenty o délkách menších než 100 bp nebyly identifikovány.



Obrázek 20: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů typových kvasinek pomocí restrikční endonukleázy *MseI*.

Tabulka 15: Délky restričních fragmentů získané štěpením PCR produktů restriční endonukleázou MseI.

Název	Pracovní označení	Délky PCR produktu [bp]	Délky restričních fragmentů [bp]
<i>Debaryomyces hansenii</i>	120	650	290+130+100
<i>Debaryomyces hansenii</i>	126	650	290+130+100
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	148	650	400+150+100
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	130	520	320+100+60
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	132	520	320+100+60
<i>Zygosaccharomyces balilii</i>	154	790	270+260+140+110
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	144	650	320+220+110
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	147	650	320+220+110
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	127	650	320+220+110
<i>Sporobolomyces roseus</i>	121	650	560+480+380
<i>Sporobolomyces roseus</i>	131	650	520+50
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	119	750	250+120+80+70+50
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	125	750	250+120+80+70+50
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	123	800	210+140+120
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	118	750	650 +100
<i>Pichia fermentans</i>	145	450	neštěpeno
<i>Pichia fermentans</i>	149	450	neštěpeno
<i>Pichia fermentans</i>	150	450	neštěpeno
<i>Pichia membranifaciens</i>	122	500	neštěpeno
<i>Pichia kudriavzevii</i>	135	530	470
<i>Pichia kudriavzevii</i>	136	530	470
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	151	450	500+300
<i>Pichia scaptomyzae</i>	153	530	220+190+120
<i>Pichia manshurica</i>	129	500	250+150
<i>Pichia sporocuriosa</i>	134	450	320+120
<i>Pichia manshurica</i>	128	500	250+150
<i>Yarrowia lipolytica</i>	124	380	280+60+40
<i>Yarrowia lipolytica</i>	139	380	280+60+40

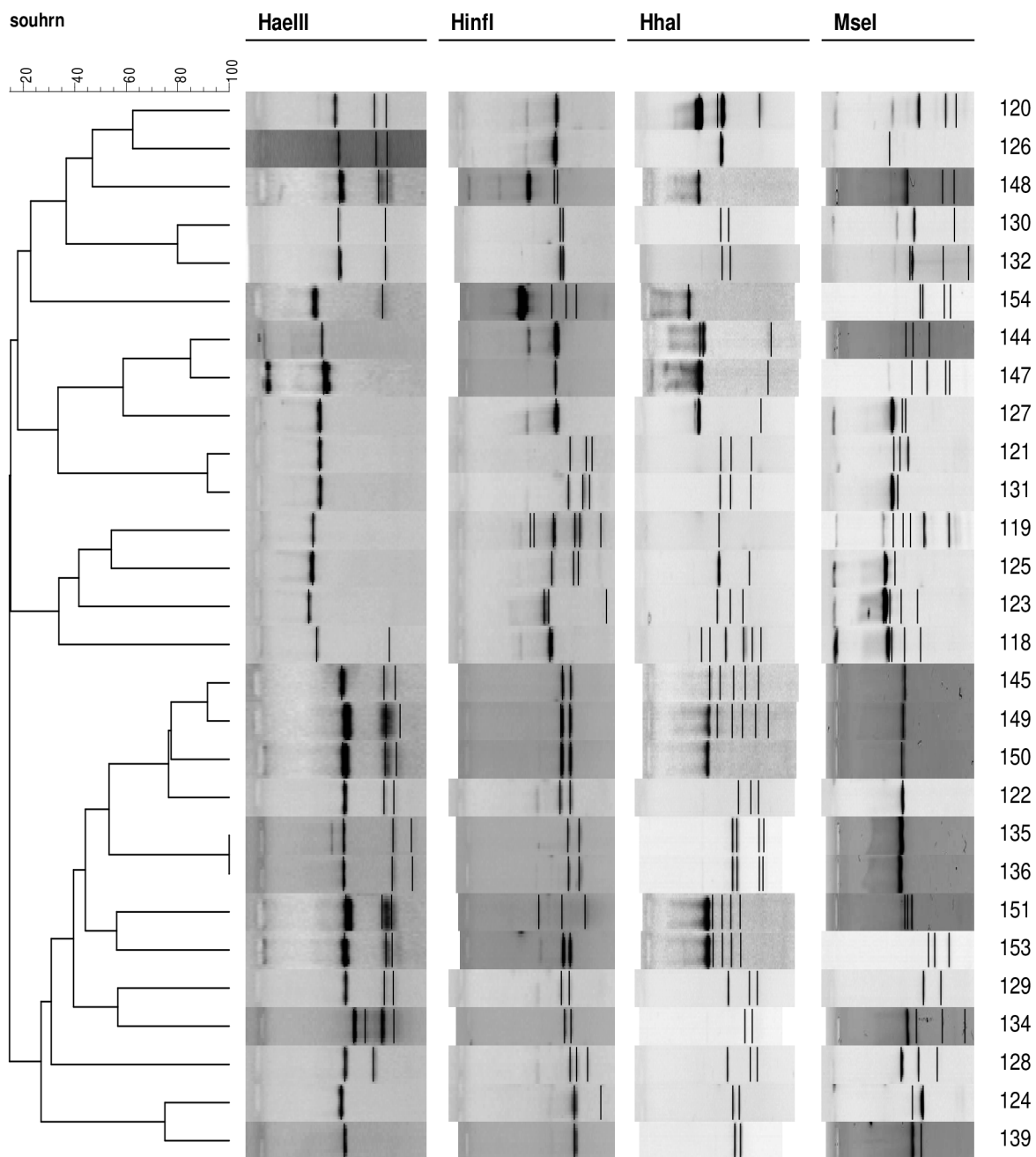
4.2.4 Dendrogram typových kvasinek

Získané elektroforeogramy jednotlivých restrikčních analýz byly zpracovány ve statistickém programu BioNumerics. Pomocí UPGMA klastrové analýzy byly sestaveny dendrogramy, kde byly jako kritérium zvoleny Jaccardovy koeficienty na úrovni 3 %. Dendrogram všech typových kvasinek je znázorněn na obrázku 21. V rámci testování na základě statistického vyhodnocení délek restrikčních fragmentů získaných restrikčními analýzami pomocí enzymů *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *MseI* došlo k identifikaci kvasinek na rodové a druhové úrovni. U některých kvasinek došlo k rozdělení i na úrovni kmenové, tento fakt by však musel být doložen rozsáhlejším testováním fyziologie daných kvasinek.

Také byla zjištěna genetická podobnost testovaných typových kvasinek. U testovaných kvasinek *Debaryomyces hansenii* (120 a 126) byla zjištěna podobnost na úrovni 60 % a se vzorkem 148 kvasinky *Meyerozyma guilliermondii* měly 50% podobnost. U kvasinek *Wickerhamomyces anomalus* byla mezi vzorky 144 a 147 zjištěna podobnost na úrovni 70 % a mezi těmito dvěma vzorky a vzorkem 127 podobnost 50 %. U kvasinek *Sporobolomyces roseus* (121, 131) byla stanovena 90% podobnost. U kvasinek rodu *Hanseniaspora* byla zjištěna 50% podobnost u vzorků 119 a 125, které představovaly *Hanseniasporu uvarum* a jejich podobnost na úrovni 30 % se vzorkem 118 – *Hanseniaspora guilliermondii*.

U testovaných typových kvasinek rodu *Pichia* byla statistickým zpracováním restrikčních fragmentů za použití všech 4 enzymů zjištěna podobnost na úrovni 30 %. Přičemž u vzorků 135 a 136 – *Pichia kudriavzevii* byla vyhodnocena 100% shoda. U kvasinek *Pichia fermentans* byla stanovena 90% podobnost u vzorků 145 a 146 a jejich podobnost se vzorkem 150 na úrovni 80 %.

Zjištěné výsledky byly přidány do databáze a budou sloužit k taxonomickému zařazení kvasinek v budoucích studiích.



Obrázek 21: Dendrogram genetické podobnosti typových kvasinek sestavený na základě výsledků z restrikční analýzy pro enzymy *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *MseI*.

5 ZÁVĚR

V diplomové práci byla sepsána literární rešerše, která je zaměřena na kvasinky vyskytující se ve víně a na metody jejich identifikace. První část rešerše pojednává o víně a vinařství. Druhá část zahrnuje morfologii, cytologii a metabolismus kvasinek se zaměřením na ethanolové kvašení a byly zde popsány rody kvasinek, které se nejčastěji ve víně vyskytují. Ve třetí části rešerše byly popsány metody identifikace kvasinek, zejména metoda RFLP-PCR, která byla prakticky využita při identifikaci analyzovaných kvasinek.

V experimentální části byly identifikovány kvasinky izolované z vinného moštu v průběhu kvašení. Hrozny pro výrobu vína pocházely z obce Kobylí a víno bylo vyrobeno ve vinařství OENOGALA. V experimentu byl sledován vliv autochtonní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kterou byl mošt zaočkován, na průběh kvašení i výsledné víno. Metodou RFLP-PCR za použití restrikčních endonukleáz *HaeIII*, *HinfI* a *HhaI* bylo zjištěno, že tato kvasinka měla v celém průběhu kvašení dominantní postavení. Dalšími identifikovanými kvasinkami byly *Pichia membranifaciens*, *Pichia fluuxum* a třetí skupinu kvasinek rodu *Pichia* se provedenými experimenty a porovnáním výsledků s databází nepodařilo blíže specifikovat.

Další náplní experimentální části bylo doplnění databáze o 28 typových kvasinek. Tyto kvasinky pocházely ze sbírky mikroorganismů CCY – Culture Collection of Yeasts z Bratislavy. Izolovaná DNA z těchto kvasinek byla testována pomocí PCR a restrikční analýzy za použití restrikčních endonukleáz *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* a *MseI*. Získané fragmenty byly elektroforeticky detekovány a statisticky vyhodnoceny v programu BioNumerics. Získané délky fragmentů byly doplněny do databáze kvasinek a budou sloužit k identifikaci kvasinek pro další studie.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 246 s. ISBN 80-708-0239-1.
- [2] LEA, A. *Fermented Beverage Production*. 1. vyd. London: Blackie Academic and Professional, 2000, 428 s. ISBN 07-514-0027-0.
- [3] WALKER, Graeme M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1998. ISBN 04-719-6446-8.
- [4] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [5] ECHEVERRIGARAY, Sergio, Marta RANDON, Keoma SILVA, Jucimar ZACARIA a Ana Paula Longaray DELAMARE. *Identification and characterization of non-saccharomyces spoilage yeasts isolated from Brazilian wines*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013, vol. 29, issue 6, s. 1019-1027. DOI: 10.1007/s11274-013-1265-9.
- [6] PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovinařů: obrazová encyklopedie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 96 s. ISBN 80-247-1247-4.
- [7] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [8] KRAUS, Vilém. *Nová encyklopedie českého a moravského vína: 1 díl*. Praha: Praga Mystica, 2005, 2 v. ISBN 80-8676700-0.
- [9] KRAUS, Vilém. *Nová encyklopedie českého a moravského vína: 2. díl*. Praha: Praga Mystica, 2008/2009, 2 v. ISBN 978-808676709-3.
- [10] JACKSON, Ronald S. *Wine science: principles and applications*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2008. ISBN 978-012-3736-468.
- [11] PAVLOUŠEK, Pavel. *Encyklopedie révy vinné*. 2., aktualiz. vyd. Brno: Computer Press, 2008, 316 s. ISBN 978-80-251-2263-1.
- [12] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [13] HUDECOVÁ, Ludmila a Viktor MAJTÁN. *Mikrobiológia I*. 1. vyd. Bratislava: STU, 2002, 363 s. ISBN 80-227-1663-4.

- [14] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4990-1.
- [15] RIBÉREAU-GAYON, Pascal, Denis DUBOURDIEU, Bernard DONÈCHE a Aline LONVAUD. *Handbook of enology*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2006-, 2 v. ISBN 04-700-1037-1.
- [16] VESELÁ, Mária a Milan DRDÁK. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. přepr. vyd. Brno: VUT v Brně, 1999. ISBN 80-214-1305-0.
- [17] ALBERTS, Bruce. *Essential cell biology*. 2nd ed. New York, NY: Garland Science Pub., c2004. ISBN 08-153-3480-X.
- [18] VOET, Donald a Judith G VOET. *Biochemistry*. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2011, xxv, 1428, 53 p. ISBN 04-709-1745-8.
- [19] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990, 704 s. ISBN 80-050-0644-6.
- [20] FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., J.C. ESPINOSA, J.F. ÜBEDA a A.I. BRIONES. *Yeasts Present During Wine Fermentation: Comparative Analysis of Conventional Plating and PCR-TTGE*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2001, vol. 24, issue 4, s. 634-638. DOI: 10.1078/0723-2020-00072.
- [21] LIANG, Heng-Yu, Jing-Yu CHEN, Malcolm REEVES a Bei-Zhong HAN. *Aromatic and sensorial profiles of young Cabernet Sauvignon wines fermented by different Chinese autochthonous Saccharomyces cerevisiae strains*. *Food Research International*. 2013, vol. 51, issue 2. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.01.056.
- [22] QUEROL, Amparo a Graham FLEET. *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer, c2006, 453 p. ISBN 978-354-0283-881.
- [23] ROSE, Anthony H. a J. S. HARRISON. *The yeasts: Volume 3, Yeast technology*. London: Academic press, 1970. SBN 12-596403-X.
- [24] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9.
- [25] VILLA-CARVAJAL, Mercedes, Amparo QUEROL a Carmela BELLOCH. *Identification of species in the genus Pichia by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006, vol. 90, issue 2, s. 171-181. DOI: 10.1007/s10482-006-9071-0. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-006-9071-0>.

- [26] MAQUEDA, Matilde, Francisco PÉREZ-NEVADO, José A. REGODÓN, Emiliano ZAMORA, María L. ÁLVAREZ, José E. REBOLLO a Manuel RAMÍREZ. *A low-cost procedure for production of fresh autochthonous wine yeast*. Journal of Industrial Microbiology. 2011, vol. 38, issue 3. DOI: 10.1007/s10295-010-0790-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-010-0790-x>.
- [27] RISTEZZA, Mariana, Cosimo VETRANO, Gianluca BLEVE, Francesco GRIECO, Maria TUFARIELLO, Angela QUARTA, Giovanni MITA, Giuseppe SPANO a Francesco GRIECO. *Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines*. Journal of Industrial Microbiology. 2012, vol. 39, issue 1, s. 81-92. DOI: 10.1007/s10295-011-1002-z.
- [28] ESTEVE-ZARZOSO, B, A GOSTÍNCR, R BOBET, F URUBURU a A QUEROL. *Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedès' area (Spain)*. Food Microbiology. 2000, vol. 17, issue 5, s. 553-562. DOI: 10.1006/fmic.2000.0347.
- [29] BLANCO, P., I. ORRIOLS a A. LOSADA. *Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous fermentations*. Journal of Industrial Microbiology. 2011, vol. 38, issue 1. DOI: 10.1007/s10295-010-0818-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-010-0818-2>.
- [30] KÖNIG, Helmut, Gottfried UNDEN a Jürgen FRÖHLICH. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer, c2009, xviii, 522 p. ISBN 978-3-540-85462-3.
- [31] MORENO-ARRIBAS, M. Victoria a M. Carmen POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, c2009, xv, 735 p. ISBN 9780387741185-.
- [32] STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 1. Valtice: Národní salon vín, 2002, 307 s. ISBN 80-903-2010-4.
- [33] DOYLE, Michael P, Larry R BEUCHAT a Thomas J MONTVILLE. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, c2001, 872 s. ISBN 15-558-1208-2.
- [34] ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero, c1998, 1 sv. ISBN 80-902-9062-0.
- [35] SUN, Yue a Yanlin LIU. *Investigating of yeast species in wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism method*. Food Microbiology. 2014, vol. 38. DOI: 10.1016/j.fm.2013.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002013001822>.

- [36] SALMA, Mohammad, Sandrine ROUSSEAU, Anabelle SEQUEIRA-LE GRAND, Benoit DIVOL, Hervé ALEXANDRE a Valerie DE CRÉCY-LAGARD. *Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE. 2013-10-29, vol. 8, issue 10, e77600-. DOI: 10.1371/journal.pone.0077600.
- [37] PRŮŠA, R., et al.: *Multimediální učebnice DNA diagnostiky* [online]. 1. vydání. Praha: 2. lékařská fakulta UK, 1998, 5. února 2007 [cit. 2009-02-20]. Dostupný z WWW: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/newlook/default.htm>.
- [38] MÁROVÁ, Ivana a Stanislav OBRUČA. *Vybrané instrumentální úlohy z aplikované biochemie*. Vyd. 1. Brno, 2013, 167 s. ISBN 978-80-214-4788-2.
- [39] SINGLETON, Paul. *Dictionary of DNA and genome technology*. 2nd ed. Chichester [u.a.]: Wiley-Blackwell, 2010, xvi, 409 s. ISBN 978-0-470-74731-5.
- [40] ŠIPICKÝ, Matej a Július ŠUBÍK. *Genetika kvasiniek*. 1. vyd. Bratislava: Veda, 1992. ISBN 80-224-0396-2.
- [41] SNUSTAD, D a Michael J SIMMONS. *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-802-1048-522.
- [42] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a RUML. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [43] 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.
- [44] MELOUN, Milan a Jiří MILITKÝ. *Statistická analýza experimentálních dat*. Vyd. 2. uprav. rozš. Praha: ACADEMIA, 2004, 953 s. ISBN 80-200-1254-0.
- [45] NEI, Masatoshi a Sudhir KUMAR. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press, 2000, xiv, 333 p. ISBN 01-951-3585-7.
- [46] RITTICH, Bohuslav, Miroslav ŠPANO a Alena ŠPANOVÁ. *Molekulární identifikace a typizace bakterií mléčného kvašení s využitím shlukové analýzy*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014, 79 s. ISBN 978-80-214-4853-7.
- [47] ČR. Zákon č. 321/2004 Sb., o vinohradnictví a vinařství.: Sběrka zákonů. 2004, částka 105.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DNA	deoxyribonukleová kyselina
rDNA	ribozomální deoxyribonukleová kyselina
RNA	riboxynukleová kyselina
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
C	cytosin
G	guanin
A	adenin
T	thimin
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
ITS	vnitřní přepisované oblast
bp	počet párů bazí
UV	ultrafialové záření
ASVK	aktivní suché kvasinky
VBNC	vitální nekultivovatelné kvasinky (viable but non-culturable)

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Seznam typových kvasinek.

číslo CCY	Rod	Druh	Původ	Pracovní označení
29-26-21	<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	kontaminovaná půda	139
29-26-34	<i>Yarrowia</i>	<i>lipolytica</i>	kukuřice	124
38-1-35	<i>Wickerhamomyces</i>	<i>anomalus</i>	list švestky	144
38-1-38	<i>Wickerhamomyces</i>	<i>anomalus</i>	květy švestky	127
38-1-16	<i>Wickerhamomyces</i>	<i>anomalus</i>	neznámý původ	147
35-6-6	<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>balilii</i>	Type	154
29-5-5	<i>Pichia</i>	<i>kudriavzevii</i>	játra žáby	135
29-9-42	<i>Pichia</i>	<i>kudriavzevii</i>	květy švestky	136
29-55-3	<i>Issatchenkia</i>	<i>occidentalis</i>	tropické ovoce	151
39-1-26	<i>Pichia</i>	<i>sporocuriosa</i>	plod švestky	134
29-93-4	<i>Pichia</i>	<i>scapromyzae</i>	list třešně	153
39-63-1	<i>Pichia</i>	<i>manshurica</i>	plod hrušky	128
39-1-12	<i>Pichia</i>	<i>manshurica</i>	Japonská sbírka	129
39-1-27	<i>Pichia</i>	<i>membranifaciens</i>	plod švestky	152
39-1-21	<i>Pichia</i>	<i>membranifaciens</i>	sediment z jezera	122
39-4-8	<i>Pichia</i>	<i>fermentas</i>	plod hrušky	150
39-4-7	<i>Pichia</i>	<i>fermentas</i>	voda řeky Moravy	149
39-4-6	<i>Pichia</i>	<i>fermentas</i>	voda Morava	145
41-6-17	<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	květy hrušky	120
41-6-21	<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	plod broskvoně	137
41-6-15	<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>	zatravněná půda	126
41-24-2	<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	dub	123
21-22-1	<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	neznámý původ	132
21-22-3	<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	neznámý původ	130
19-6-10	<i>Sporobolomyces</i>	<i>roseus</i>	voda Morava	131
19-6-16	<i>Sporobolomyces</i>	<i>roseus</i>	listy javoru	121
39-23-6	<i>Meyerozyma</i>	<i>guilliermondii</i>	list jabloně	148
25-9-3	<i>Hanseniaspora</i>	<i>guilliermondii</i>	voda jezera	118
46-3-17	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	hrozny	125
25-6-33	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	plod jabloně	119