

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fermentační schopnost autochtonních kvasinek
izolovaných z regionu VOC Modré Hory**

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Konzultant: doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

Autor práce: Bc. David Klaudy

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Fermentační schopnost autochtonních kvasinek izolovaných z regionu VOC Modré Hory" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2015

Poděkování

Rád bych touto cestou upřímně poděkoval vedoucí mé práce, prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, poskytnuté rady a za čas, který mi věnovala. Dále bych rád poděkoval Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D. za pomoc během praktické části experimentu.

Fermentační schopnost autochtonních kvasinek izolovaných z regionu VOC Modré Hory

Souhrn

Pro průmyslovou produkci vína je nejdůležitějším používaným druhem kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Dlouholeté zkušenosti vinařů ukázaly, že kvalita vína a originalita jsou značně ovlivněny použitou fermentační kulturou. Konvenčně vyráběná vína však mohou působit uniformním dojmem. Proto je v dnešních moderních vinařských technologiích třeba identifikovat vhodné kvasinkové kultury pro fermentaci určitých odrůd. Poměrně novým trendem v dnešní vinařské výrobě je použití autochtonních kvasinek jako iniciačních kultur. Vínu mohou dodat širší a zajímavější aromatické spektrum a také plnější chuť než při použití komerčních kmenů. Zároveň použití vybraných kultur zdůrazní typické sensorické rysy vyrobených vín pro konkrétní vinařský region (terroir).

Cílem této diplomové práce bylo porovnání vlastností a fermentačních aktivit u 34 kmenů kvasinek vyizolovaných z vinařského regionu VOC Modré. Kvasinky byly identifikovány a charakterizovány pomocí biochemických a molekulárně-biologických metod. Kultury byly izolovány z kvasů ve fázi bouřlivého kvašení za použití Malt Extract agar (Oxoid). K identifikaci byly použity biochemické soupravy API 20 C AUX (bioMérieux) a API ID 32 C (bioMérieux) určené pro identifikaci bakterií a kvasinek. Téměř všechny kmeny byly identifikovány jako *Saccharomyces cerevisiae*, což potvrdila i rep-PCR. Dále byly soupravou API ZYM (bioMérieux) zjištěny enzymatické aktivity, které byly u všech kmenů téměř stejné. V rámci fermentačního experimentu nebyly mezi kmeny shledány žádné podstatné rozdíly ve schopnosti mošt prokvasit. Všechny kultury mošt prokvasily s průměrnou hodnotou produkce etanolu kolem 11 % a průměrnou hodnotou zbytkového cukru 52,40 g/l.

Z dosažených výsledků vyplývá, že všechny testované kultury patří do stejného druhu (*Saccharomyces cerevisiae*) a produkce alkoholu nezávisela na konkrétním kmeni kvasinek, ale na složení moštu. Všechny vybrané kmeny prokázaly velmi podobné fermentační schopnosti.

Klíčová slova: autochtonní kvasinky, identifikace, vinný mošt, fermentace, VOC Modré Hory

Fermentation ability of autochthonic yeasts from VOC Modré

Hory region

Summary

The most important species of yeast for industrial production of wine is *Saccharomyces cerevisiae*. Longstanding experience of wine makers has shown that quality and originality of wine is immensely affected by the choice of fermentation culture. Conventionally produced wines though can savour uniformly. Therefore the identification of suitable yeast culture for fermentation of specific vine varieties is nowadays necessary for modern wineries. Relatively new trend in present viticulture is using of autochthonous yeasts as starting culture. This can provide wider and more interesting aroma spectrum for wines as well as fuller taste than usage of commercial strains. The application of chosen cultures can also emphasize on typical sensorial characteristics of wines made in the particular wine region (terroir).

The objective of this diploma thesis was to compare enzymatic and fermentation characteristics of 34 yeast strains isolated from wine region VOC Modré Hory. Yeasts were identified and characterized by using biochemical and molecular-biological methods. Cultures were isolated from grape juice in exponential phase of fermentation using Malt Extract Agar (Oxoid). Kits API 20 C AUX (bioMérieux) and API ID 32 C (bioMérieux) were used for identification of yeasts. Almost all cultures were identified as *Saccharomyces cerevisiae*, which was also confirmed by rep-PCR. Using API ZYM (bioMérieux) enzymatic activities of yeasts were detected and almost all of the cultures showed similar activity. No significant differences in ability to ferment the must were found among the strains within the fermentation experiment. All cultures (strains) fermented musts with average value of ethanol production about 11% and average value of residual sugar 7 ounces per gallon (52,40 g/l).

Achieved results show that all tested cultures belong to the same species (*Saccharomyces cerevisiae*) and production of alcohol was not dependent on specific yeast strain, but on the composition of must. All chosen strains showed very similar fermentation abilities.

Keywords: autochthonous yeasts, identification, grape must, fermentation, VOC Modré Hory

Obsah

1 Úvod	8
2 Literární rešerše.....	9
2.1 Kvasinky.....	9
2.1.1 Taxonomie kvasinek	9
2.1.2 Morfologie kvasinek	10
2.1.3 Rozmnožování	11
2.1.3.1 Vegetativní rozmnožování	11
2.1.3.2 Pohlavní rozmnožování.....	12
2.1.4 Fyziologie a metabolismus kvasinek	13
2.1.4.1 Aerobní respirace	15
2.1.5 Uplatnění etanolového kvašení při výrobě vína	16
2.1.5.1 Spontánní kvašení	16
2.1.5.2 Řízené kvašení	17
2.1.5.3 Aktivátory a inhibitory fermentace	19
2.2 Technologie výroby vína.....	20
2.2.1 Úloha kvasinek při výrobě vín.....	23
2.2.1.1 Vliv kvasinek na aroma vína.....	23
2.3 Autochtonní kvasinky	25
2.3.1 Izolace a selekce autochtonních druhů	27
2.3.2 Použití selektovaných autochtonních kvasinek pro výrobu vín.....	28
2.4 Autentické víno.....	29
2.4.1 Autentisté	29
2.5 Terroir	31
2.6 Region VOC Modré Hory	31
3 Hypotéza	33
4 Cíl práce.....	34
5 Materiál a metody	35

5.1	Charakterizace a identifikace kvasinek pomocí biochemických souprav	35
5.1.1	Identifikační kit API 20 C AUX	36
5.1.2	Identifikační kit API ID 32 C	36
5.1.3	Identifikační kit API ZYM	37
5.2	Molekulárně genetické metody	37
5.2.1	Izolace DNA kvasinek pro PCR	37
5.2.2	rep- PCR	38
5.2.3	Gelová elektroforéza	39
5.3	Testy fermentačních schopností vybraných kvasinek	39
5.3.1	Použité odrůdy a jejich cukernatost	39
5.3.2	Příprava moštů	40
5.3.3	Refraktometrické měření cukrů	40
5.3.4	Použité kvasinky	41
5.3.5	Fermentace	41
5.3.6	Analytické metody použité pro vyhodnocení	42
5.3.6.1	Plynová chromatografie	42
6	Výsledky	44
6.1	Vyhodnocení enzymatických a fermentačních mikrotestů	44
6.1.1	API 20 C a API ID 32 C	44
6.1.2	API ZYM	45
6.2	Vyhodnocení identifikace pomocí rep-PCR	47
6.3	Vyhodnocení fermentačních schopností kvasinek	48
7	Diskuze	52
8	Závěr	59
9	Seznam použité literatury	60

1 Úvod

Kvasinky jsou mikroorganismy, které jsou hojně využívány v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, ale i v řadě vědních oborů a technologiích po celém světě. Kvašení znali již staří Babyloňané, 6000 až 4000 let před naším letopočtem, připravovali polévku z naklíčeného obilí. V teplém a vlhkém prostředí polévka do večera zkvasila a tak získala příjemnou opojnou chuť. Samotné kvasinky však byly popsány až po objevení mikroskopu, neboť jejich rozměry jsou pod hranicí viditelnosti. Jsou jedním z nejvíce probádaných eukaryotních mikroorganismů a poznatky o nich přispěly k hlubšímu poznání biologie eukaryot.

Pojem kvasinka je dnes téměř ztotožňován s druhem *Saccharomyces cerevisiae*, který je nejvíce využíván při výrobě alkoholických nápojů, droždí a octu. Kvasinkové kultury jsou však velmi rozmanité a některé mají dokonce patogenní účinky, jako například *Candida albicans* (původce infekcí u lidí). Nedávno se začala využívat jejich fermentační schopnost i pro produkci etanolu pro „biopaliva“. Kvasinky jsou běžně přítomny na zemědělských plodinách (réva vinná atd.) a všude tam, kde mají dostatek substrátu pro přežití a rozmnožování.

Využití kvasinek v této době si vyžaduje přesnou identifikaci na rodovou a druhovou úroveň. Mnoho druhů je hojně využíváno pro produkci svých sekundárních metabolitů nebo biomasy. V moderních biotechnologiích hrají zcela nezastupitelnou roli. Aby byl plně využit potenciál těchto mikroorganismů, je třeba analyzovat vlastnosti použitých kmenů.

2 Literární rešerše

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní heterotrofní organismy, které patří do říše Protista. Od ostatních eukaryot se liší především tvorbou silné a pevné buněčné stěny. Jako zdroj uhlíku a energie slouží kvasinkám hlavně sacharidy, které mohou "zpracovat" aerobní respirací či kvašením.

Využití kvasinek je velmi rozmanité. Nezastupitelný význam mají v potravinářském průmyslu zejména při výrobě pekařského a krmného droždí, piva, vína a lihu. Moderní biotechnologie využívají kvasinky pro produkci nejrůznějších látek (vitamíny, enzymy, antibiotika, aminokyseliny, bílkoviny). Tyto kvasinky mohou být geneticky upravovány tak, aby získaly nové a lepší vlastnosti a syntetizovaly požadované látky. Díky relativně snadnému zacházení (isolace mutantů, přenos genů, kultivace, atd.) a znalosti genomu jsou kvasinky vhodným modelovým organismem pro studium fyziologických a metabolických pochodů i genetiky eukaryot. Mimo to ale některé rody kvasinek patří mezi patogeny, které jsou významné zejména pro jedince s oslabenou imunitou (Kopecká et al., 2012).

Kvasinky poprvé pozoroval A. van Leeuwenhoek kolem roku 1680, který je popsal ve svých dopisech Královské společnosti v Londýně jako malé kuličky v pivě. Theodor Schwann pojmenoval v r. 1837 dnešní *Saccharomyces cerevisiae* jako Zuckerpilz (= cukerná houba, řec. Saccharos = cukr, mykes = houba). České pojmenování je odvozeno od schopnosti většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, výjimečně i trisacharidy. Jejich výskyt je díky těmto sacharolytickým schopnostem spojen se substráty obsahujícími cukry. Kvasinky lze nalézt zvláště na bobulovém a peckovém ovoci, cukernatých plodinách, ale i v půdě, vodě a ve střevním traktu (Kopecká et al., 2012).

2.1.1 Taxonomie kvasinek

Objevy v mikrobiologii v minulém století ukázaly, že taxonomické dělení do dvou říší *Animalia* a *Plantae*, od roku 1925, je nedostačující. V roce 1978 biologové v čele s Robertem H. Whittaker rozdělili organismy do následujících pěti říší: *Procaryotae*, *Protista*, *Fungi*, *Animalia*, *Plantae*. Zařazení do těchto říší proběhlo na základě nejméně tří hlavních kritérií:

- 1) buněčný typ - prokaryotní nebo eukaryotní
 - 2) úroveň organizace buněčných struktur - jednobuněčné, jednobuněčné vytvářející kolonie, mnohobuněčné organismy
 - 3) způsob přijímání potravy - autotrofové, heterotrofové
- (Prescott et al., 1996).

Říše *Protista*, kam řadíme kvasinky, je nejméně homogenní a nejhůře definovatelná skupina organismů. Protisté jsou jednobuněčné eukaryoty žijící jako samostatné buňky či v koloniích, kterým chybí pravé tkáně. Potravu mohou přijímat pozřením, absorpcí povrchem či jako fotoautotrofové. Mezi tyto organismy patří většina řas, prvoků a jednoduchých hub. Systém pěti říší není přijímán všemi mikrobiology. Říše *Protista* je příliš různorodá na to, aby byla taxonomicky užitečná. Navíc hranice mezi říšemi *Protista*, *Plantae* a *Fungi* jsou špatně definovány (Prescott et al., 1996). V současnosti je známo více než 1500 druhů kvasinek, které patří do oddělení *Ascomycota* a *Basidiomycota*, ale pouze malá část z těchto druhů byla důkladně geneticky analyzována. Zmapování fylogeneze kvasinek proběhlo na základě komparativní genomiky a poznatků evoluce (Kurtzman et Piskur, 2006).

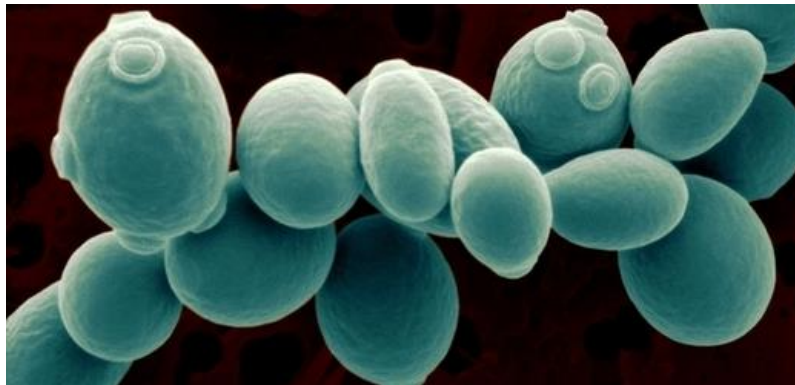
2.1.2 Morfologie kvasinek

Buňky kvasinek mají velikost 3 – 15 μm a oproti bakteriálním jsou přibližně desetkrát větší. Velikost a tvar buňky je dán rodovou příslušností, kultivačními podmínkami a typem rozmnožování. Tvarově se mohou kvasinky podobat elipsoidu či kouli. Známé jsou i jejich protáhlé až hyfovitě struktury.

Kvasinka má buněčnou stěnu silnou 150 – 400 nm, která je pevná, aby odolávala velkému osmotickému tlaku. Složení sušiny druhu *Saccharomyces cerevisiae* představuje 40-60 % dusíkatých látek, 15-35 % sacharidů, 6-12 % minerálních látek a 2-12 % lipidů (Bendová et Kahler, 1981).

Poměrně často kvasinky vytváří pseudomycelia (zobrazeno na obrázku č. 1). V této formě kultura roste tzv. přehrádečným dělením (Janderová et Bendová, 1999).

Obr. č. 1 - Část pseudomycelia vytvořené kvasinkami (Black et Wiley, 1999)



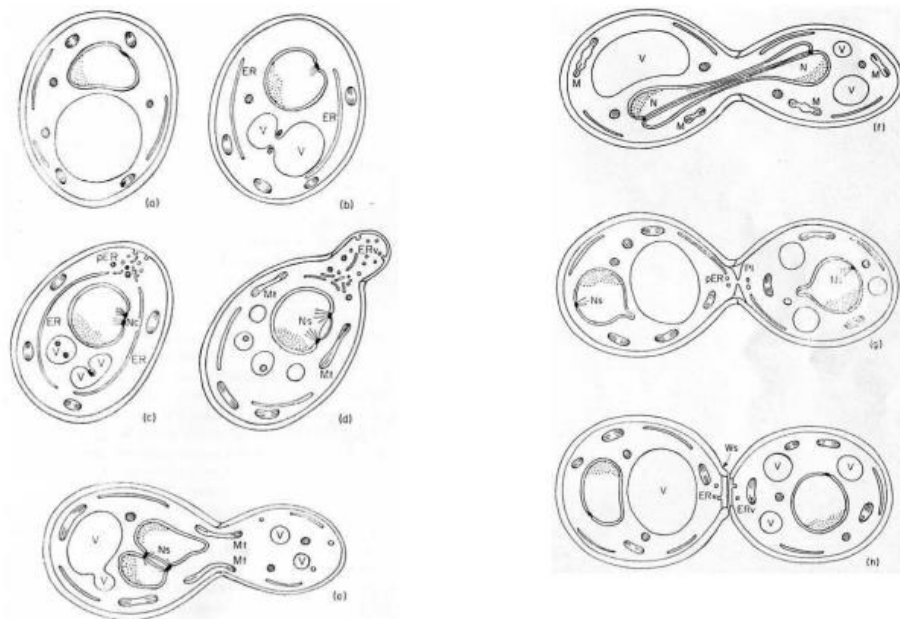
2.1.3 Rozmnožování

U kvasinek je známo, že se mohou rozmnožovat jak vegetativně, tak i pohlavně. Vegetativně se kvasinky rozmnožují pučením nebo dělením. Pohlavně se množí v rámci haploidních pohlavně odlišných párovacích typů (Šilhánková, 2002). Oba typy jsou popsány v kapitolách níže.

2.1.3.1 Vegetativní rozmnožování

Kvasinky jsou charakteristické tím, že se vegetativně množí převážně pučením (zobrazeno na obrázku č. 2) a vytvářejí okem viditelné kolonie. Během pučení vzniká pupen na mateřské buňce, který se stále zvětšuje až do okamžiku fragmentace všech buněčných organel, kdy část organel putuje do pupenu. Zúžené místo mezi mateřskou buňkou a pupenem se zaškrcuje plazmatickou membránou a buněčnou stěnou a vzniklá dceřiná buňka se odděluje. Vegetativně rostoucí buňky jsou převážně diploidní, ale mohou být i polyploidní. Pučení se může opakovat přibližně 35krát. Po oddělení dceřiné buňky zůstává v místě jejího vzniku mateřská jizva, na oddělené buňce jizva dceřiná (Basařová et al, 2010). Podle počtu jizev lze určit individuální stáří buňky, a proto se kvasničné buňky používají při studiu mechanismů stárnutí (Zandycke et al., 2000). Na jizvách dochází ke snížené látkové výměně a to je důvodem, proč kvasinky s mnoha jizvami nejsou tak výkonné jako "mladé" kvasinky (Basařová et al, 2010).

Obr. č. 2 - Rozmnožování kvasinky pučením (Rose et Harrison, 1969)



a = buňka v klidu, b = splynutí částí endoplazmatického retikula (ER), dělení vakuol, c = prodlužování ER, dělení polárního tělíska, d = dělení ER, vznik pupenu a dělicího vřeténka, e = migrace vakuol a mitochondrií do pupenu, mitotické dělení jádra, f = migrace jádra do pupenu, g = vytvoření cytoplazmatické membrány, h = dělení buněčných organel v pupenu, vytvoření buněčné stěny

2.1.3.2 Pohlavní rozmnožování

U většiny dosud objevených kvasinek je znám i pohlavní způsob rozmnožování, podle kterého rozdělujeme kvasinky do dvou tříd: *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*, které se liší nejen způsobem rozmnožování. Druhy kvasinek, u kterých nebylo dokázáno pohlavní rozmnožování, se zařazují do pomocné třídy *Deuteromycetes* a označují se jako tzv. imperfektní neboli anamorfní formy (tzn., že u nich existuje jen jeden párovací typ) *Ascomycetes* nebo *Basidiomycetes* (Kocková et Kratochvílová, 1990). Dva různé párovací typy se liší např. vylučováním různých látek ovlivňujících druhý typ, povrchovým složením buněčné stěny, atp. (Šilhánková, 2002).

2.1.4 Fyziologie a metabolismus kvasinek

Kvasinky jsou mikroorganismy s proměnlivým metabolismem. V přítomnosti kyslíku respirují, v nepřítomnosti používají fermentační metabolickou dráhu. Metabolismus však není tak jednoduchý, kvasinky jsou mikroorganismy, u kterých se projevuje Pasteurův efekt, což je jev, který byl poprvé pozorován Louistem Pasteurem. Podstatou jevu je fakt, že v přítomnosti kyslíku se u kvasinek zpomaluje kvašení a zrychluje se růst kultury. Důležitý faktor zde hraje také koncentrace cukrů v roztoku. Pasteurův efekt se nejvíce projevuje při hodnotách cukernatosti roztoku 1 až 9 g/l. Vysvětlení tohoto jevu je celkem prosté. Aerobní respirace uvolní z glukosy 19x více energie než anaerobní fermentace. Kvasince tak zajišťuje více energie pro metabolismus. Pasteurův efekt není jen záležitostí kvasinek, ale je rozšířen i u většiny fakultativně anaerobních bakterií. Potravinářský průmysl prakticky využívá Pasteurova jevu v obou směrech. Je-li cílem produkce alkoholu alkoholovým kvašením, je kultura udržována v anaerobním stavu. Je-li naopak potřeba vyprodukovat hodně biomasy (např. při produkci kvasnic), je kultura aerována a roste rychleji (Sierkstra et al., 1993).

U kvasinek byl také pozorován tzv. Crabtreeho efekt (glukosová represe), který byl poprvé pozorován Herbertem Crabtreeem. Jedná se o opak Pasteurova efektu. Mají-li kvasinky k dispozici velkou koncentraci glukosy, pak fermentují i v přítomnosti kyslíku. Vysoká koncentrace glukosy tedy potlačuje aerobní metabolismus. Preference fermentace proti respiraci nemá jednoduché logické zdůvodnění, organismus tak získá méně energie. Jev není dosud spolehlivě objasněn, v zásadě jsou navrženy dvě hypotézy. První hypotézou je plýtvání. Crabtreeho efekt se projevuje jen při opravdu velkých koncentracích (60 g/l a více) glukosy. Je proto možné, že při takovém nadbytku substrátu si organismus dovolí „plýtvat“, tedy využívat glukosu neekonomicky fermentačně. Fermentace sice uvolní méně energie, ale vyžaduje podstatně méně enzymů a je tak pro organismus jednodušší. Druhou hypotézou je konkurence. Protože kvasinky jsou k etanolu poměrně odolné, předpokládá se, že produkce etanolu inhibuje potenciální konkurenční mikroorganismy (např. gramnegativní bakterie rodu *Zymomonas*) v boji o bohatý zdroj energie. Uplatní se např. na uzrálém ovoci, které je plné sacharidů (Sierkstra et al., 1993). Dostatečný přísun živin, vhodná teplota a pH prostředí vede u kvasinek k intenzivnímu metabolismu a rychlé syntéze biomasy. Ta se za optimálních podmínek (25 °C a pH 4 až 6) u *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Candida utilis* za každé 2 hodiny zdvojnásobí (Vodrážka, 2006).

Na růst a rozmnožování potřebují kvasinky správnou výživu. Výživu přijímají ze živného prostředí (živná půda, živina nebo živné médium), které musí splňovat určité předpoklady.

Základní složky výživy jsou:

1. voda
2. zdroj uhlíku a dusíku
3. prvky důležité na výstavbu živé hmoty: kyslík, uhlík, dusík, fosfor, síra a hořčík
4. stopové prvky nebo mikroelementy: měď, jód, molybden, kobalt a zinek
5. vitamíny a růstové látky: biotin, thiamin, pyridoxin a leucin

(Kocková-Kratochvílová, 1982)

Zdrojem uhlíku a energie pro kvasinkové kultury bývají mono- a disacharidy, méně pak oligo- či polysacharidy ale také látky jako: glycerol, laktát, etanol, metanol a alkany. Schopnost kvasinek využít různé cukry se liší v závislosti na aerobních či anaerobních podmínkách. Některé kmeny nemohou růst anaerobně na sacharose ani trehalose (Herskowitz, 1988).

Všechny kmeny *Saccharomyces cerevisiae* mohou aerobně růst na glukose, maltose a trehalose. Nemohou aerobně růst na laktose a celobiose. Nicméně růst na jiných cukrech je velmi variabilní. Ukázalo se, že galaktosa a fruktosa jsou nejlépe fermentovatelné cukry (Niimura et al., 1989). Jakmile je dodána glukosa kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae*, které vyrostly na jiných substrátech než na cukrech (glycerol, laktát), aktivují se jejich geny pro syntézu glykolytických proteinů. Oproti tomu, exprese genů odpovídajících za mitochondriální funkce a glukoneogenezi je potlačena. Přítomnost glukosy také způsobuje aktivaci cytoplasmatické ATPasy. Byly tedy objeveny proteiny, jejichž aktivita je regulována glukosou. Mají vliv na proteosyntézu, příjem živin, glykolysu, glukoneogenezi i mitochondriální funkce kvasinky (Giardina et al., 2012). Všechny kvasinky mají schopnost využít amoniak a močovinu jako primární zdroje dusíku. Nemohou využít nitráty, pokud nedisponují schopností redukovat je na amonné ionty. Mají schopnost využívat také aminokyseliny, peptidy a dusíkaté báze jako další zdroje dusíku. Nicméně aminokyseliny jako histidin, glycin, cystein a lysin jsou pro kvasinky obtížně využitelné. *Saccharomyces cerevisiae* nesyntetizuje proteasy, tudíž extracelulární proteiny nedokáže využít (Herskowitz, 1988). Uhlíkaté sloučeniny zpracovává většina kvasinek aerobní glykolýzou a následně citrátovým neboli Krebsovým cyklem. Při distribuci pyruvátu

vznikajícího mezi respirační a fermentativní reakcí je důležitá aktivita pyruvátdehydrogenasy, která se nachází v mitochondriích a produkuje acetylkoenzym A pro vstup do Krebsova cyklu a cytoplasmatické pyruvátdekarboxylasy, která napomáhá vzniku acetaldehydu a tím i etanolu (Pronk et al., 1996).

Zástupci fakultativně anaerobních kvasinek, kterými jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* či rod *Brettanomyces*, mají geny pro tvorbu enzymů aldehyddehydrogenasa a alkoholdehydrogenasa, díky kterým mohou fermentovat cukry na etanol a oxid uhličitý. Typickými zástupci obligatorně aerobních kvasinek jsou *Rhodotorula*, *Saccharomycopsis*, *Cryptococcus* nebo *Lipomyces*. Tyto kvasinky nemají gen pro tvorbu enzymu alkoholdehydrogenasa, tudíž nemohou fermentovat a produkovat etanol. Jejich konečnými metabolity jsou voda a oxid uhličitý (Janderová et Bendová, 1999).

Produkty metabolismu kvasinek mohou být nejen CO₂, etanol, H⁺, ale i glycerol, acetát, sukcinát, laktát atd. U různých kmenů lze poměry produktů ovlivnit kultivačními podmínkami. Některým druhům vyhovuje různé rozmezí teplot; podle toho kvasinky členíme na psychrofilní (0 - 20 °C), mezofilní (25 - 40 °C) a termofilní (48 °C a více) (Kopecká et al., 2012).

2.1.4.1 Aerobní respirace

Fakultativně anaerobní kvasinky upřednostňují aerobní respiraci, protože je energeticky mnohem výhodnější než kvašení (Vodrážka, 2006). Při nadbytku může být organický substrát, který slouží jako zdroj energie, pouze částečně oxidován za vzniku velkého množství organického produktu. Toho se průmyslově využívá při aerobní kvasné výrobě některých organických kyselin, např. kyseliny citrónové u *Yarrowia lipolytica* (Kamzolova et al., 2003).

Pomocí Krebsova cyklu během aerobní respirace je substrát oxidován až na oxid uhličitý a vodu. Krebsův cyklus nemá za účel pouze finální oxidaci substrátů, ale také se výrazně podílí na procesech biosyntézy. Tento děj probíhá u eukaryot v matrix mitochondrií a je klasickým příkladem regulačního procesu katabolických i anabolických drah.

Energetický zisk aerobní respirace je 36 ATP. Pokud však nastane situace, kdy buňka nemá dostatek kyslíku, ale má k dispozici dostatečný zdroj glukosy, nastává proces fermentace.

2.1.5 Uplatnění etanolového kvašení při výrobě vína

Změna vinného moštu ve víno je možná díky fermentačnímu procesu, který je realizován kvasinkami. Tyto organismy se značně podílejí na chemických a organoleptických vlastnostech vína (Fleet, 2003). Primární úlohou vinných kvasinek je podpořit rychlou, úplnou a efektivní přeměnu hroznového cukru (glukosy) na etanol, oxid uhličitý, a to bez vzniku nežádoucích chutí (např. animálních tónů). Fermentace probíhá ve dvou krocích. Nejprve je dekarboxylován pyruvát (finální produkt glykolysy) pomocí enzymu pyruvátdekarboxylasa za vzniku acetaldehydu a oxidu uhličitého. Následně je acetaldehyd redukován enzymem alkoholdehydrogenasa na etanol. Uhlík je během fermentace využit z 95 % na tvorbu etanolu a oxidu uhličitého a ze 4 % na produkci sekundárních metabolitů, kterými jsou pyruvát, acetát, glycerol laktát atd. a z 1 % je uhlík využit pro tvorbu biomasy.

Kvasinky i při tomto pochodu pomalu rostou. Vzhledem k tomu, že k tvorbě etanolu je potřeba nárůst kvasinek, je žádoucí, aby kvasné médium obsahovalo určité malé množství rozpuštěného kyslíku (viz. Pasteurův efekt, který je popsán výše). Stačí, když je médium provzdušněno v počáteční fázi kvašení. Rychlost štěpení sacharidů je zpravidla větší při anaerobním procesu než při aerobním. Kvasinky jsou schopny snášet etanol pouze do určité koncentrace. To má za následek, že se rychlost fermentace výrazně snižuje při koncentraci kolem 10 – 12 % obj. etanolu v médiu. Prodloužením trvání kvasného procesu je však možné dosáhnout vyšší produkce etanolu (při výrobě japonského saké lze dosáhnout koncentrací kolem 20 % obj.) (Rychtera et al., 1987).

2.1.5.1 Spontánní kvašení

Pojmem spontánní kvašení rozumíme fermentaci vinného moštu způsobenou druhy kvasinek, které se přirozeně vyskytují na vinných hroznech. Spontánní fermentaci moštu iniciují nejdříve apikulátní kvasinky, které tvoří přirozenou mikroflóru hroznů. Kvašení probíhá samovolně a kromě šíření se neprovádějí žádné další zásahy (Farkaš, 1983).

V prvních několika dnech kvašení tvoří apikulátní kvasinky téměř 99 % populace všech kvasinek. Mezi nejčastější apikulátní kvasinky patří rody *Kloeckera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* a *Zygosaccharomyces*. Tyto nesaccharomycetní rody mají kromě vysoké růstové

rychlosti i rozsáhlou enzymatickou výbavu. Proteasy, glukosidasy, lipoxasy, esterasy, glukonasy a pektinasy spolu působí na určité složky moštu a dokáží velmi rychle ovlivnit jeho chemické složení. Tyto enzymy mohou pozitivně působit během fermentace a zároveň mohou mít příznivý vliv na aroma výsledného vína (Furdíková et al., 2007). Výše uvedené kvasinky jsou nejvíce aktivní v první fázi fermentace, tvoří velké množství glycerolu, jsou však málo tolerantní k alkoholu a pro většinu z nich je limitní hranicí koncentrace 4 až 5 % obj. etanolu (Steidl et al. 2004). Během zvyšování koncentrace alkoholu je jejich růst inhibován a ve fermentaci pokračuje rod *Saccharomyces*, který vykazuje vyšší odolnost vůči rostoucímu obsahu alkoholu a má vysokou prokvašovací schopnost (15 až 18 % obj. etanolu). V terminální fázi fermentace se populace *Saccharomyces cerevisiae* zmenšuje, je však stále přítomno více než 10^6 buněk v 1 ml. Součástí mikroflóry spontánního kvašení moštů bývají i další variety druhu *Saccharomyces cerevisiae*. *S. heterogenicus*, *S. uvarum*, *S. oviformis*, *S. pastorianus* a *S. bayanus* a jsou si morfologicky velice podobné, odlišují se jen schopností zkvašovat a asimilovat určité sacharidy. Rostoucí koncentrace etanolu nakonec omezí i aktivitu přítomných ušlechtilých kvasinek, což vede k ukončení fermentace (Furdíková et al., 2007).

Je třeba si také uvědomit, že nesacharomycetní kvasinky mohou také negativně ovlivnit kvalitu vína tvorbou vyšších alkoholů, glycerolu a těkavých kyselin nebo mikrobiálně nečistých tónů. Z praxe je však již velmi dobře známo, že vína pocházející ze spontánně zkvašených moštů mohou být plnější, disponovat plnohodnotným buketem a nenarušenou odrůdovou charakteristikou. Příčinou tohoto jevu jsou původní nesacharomycetní apikulární kvasinky. Různé ročníky spontánně kvašených vín ze stejné oblasti se mohou kvalitativně velmi lišit. To je způsobeno proměnlivou mikroflórou na stanovišti. Za určitých podmínek mohou mít tyto kvasinky neopomenutelný a příznivý vliv na chuť a aroma vína, vždy se však jedná o poměrně značné risk a ekonomickou nejistotu (Švejcar, 2004).

2.1.5.2 Řízené kvašení

Fermentace pomocí čistých kvasinkových kultur se nazývá řízené kvašení. Taková kultura se získává vegetativním namnožením jedné jediné buňky se selektovanými vlastnostmi. Kultura má tedy stejnou genetickou informaci a představuje tak klon. V rámci moderního sklepního hospodářství se používají aktivní suché vinařské kvasinky, zkráceně ASVK. Jejich použití je výhodné především pro velké objemy moštů, které rychle a

spolehlivě prokváší. Fermentace probíhá čistě a bez postranních tónů, bohužel aromatický profil je podstatně užší než při použití autochtonních kvasinek. Při jejich použití je třeba mít na paměti, že výsledná vína z různých oblastí a od různých výrobců mohou být velmi podobná a působit uniformě. To je důvodem, proč mnoho vinařů hledá jiné způsoby, jak zdůraznit originalitu jejich výrobků. Určitou alternativou může být selekce a následné použití původní vinohradnické mikroflóry autochtonních kvasinek ve spojení s výhodami ASVK. Místo čistých monokultur kvasinek je doporučováno užívat směsných kultur, které se skládají ze dvou nebo více druhů či kmenů vhodných k výrobě kvalitních vín. Směsné kultury do jisté míry nahrazují aktivitu kvasinek spontánního kvašení. Vína fermentovaná přirozeně se vyskytujícími apikulátními kvasinkami nebo přidanými směsnými kulturami mají bohatší aromatický profil než vína fermentovaná pouze jednou čistou kulturou. Použití směsných kultur má další výhodu v tom, že zde není tak velké ekonomické riziko ve srovnání s použitím neselektovaných apikulátních kvasinek. Při aplikaci vybraných směsných kultur je větší předvídatelnost výsledného produktu (Minárik, 2005).

Podle Minárika (1986) je mošt nejvíce prokvašen za použití směsné kultury kvasinek. Vznikají tak například polosuchá až suchá vína, která se těší stále větší oblibě. Nejvíce zbytkového cukru vykazovaly zákvasy, kde byly použity druhy *Candida pulcherrima*, *Kloeckera apiculata*. Nejhlubšího prokvašení bylo dosaženo u vín fermentovaných směsnými kulturami: 1) *Turoloopsis rosei*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, 2) *Turoloopsis rosei*, *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces carlsbergensis* a 3) *Turoloopsis rosei*, *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces oviformis*. Nejnižší obsah těkavých kyselin byl změřen v zkvašených moštích při aplikaci směsných kultur s *Turoloopsis rosei*, které jsou výše zmíněny. Tato vína měla dobré organoleptické vlastnosti, především příjemnou vůni a chuť. Vína zaočkovaná čistou kulturou byla také chuťově přijatelná s vyrovnanou chutí, hladina alkoholu byla však nižší podobně jako u spontánně kvašeného vína. Směsné kultury kvasinek, které jsou připraveny z oddělených zákvasů, se během fermentace vinného moštu rychleji pomnoží na začátku kvašení (*Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces vini*). V kvasech zakvašených směsnou kulturou ze společného zákvasu mívá převahu *Saccharomyces oviformis*. V průběhu kvašení moštu, kde byla použita čistá kultura při dostatečném zákvasu (2 %) dominuje především použitý druh kvasinek.

Přednosti použití selektovaných kvasinek podle Minárika (2005):

- rychlé zakvácení
- bezproblémové prokvašení celého objemu
- kvašení v širokém rozsahu teplot
- nízká tvorba pěny
- malá tvorba sekundárních metabolitů
- schopnost vysoké produkce etanolu
- rychlá sedimentace po prokvašení
- šetrnost k stabilitě barvy červených vín

Přidání ASVK je podle Minárika (2005) nezbytné v těchto případech:

- pasterizovaný mošt
- vysoká cukernatost (například u přívlastkových vín)
- mošt z nahnilých hroznů (nutné odkalit)
- u problémového kvašení z důsledku toxinů z postřiků (i zde je nutné mošt nejdříve odkalit)

2.1.5.3 Aktivátory a inhibitory fermentace

Hroznový mošt, jako surovina pro výrobu vína, obsahuje látky, které mohou ovlivňovat fermentační proces. Patří k nim enzymy, vitamíny, minerální látky, zbytky postřikových chemikálií atd. Velký vliv má také pH moštu, cukernatost, teplota během fermentace, obsah vznikajícího etanolu a obsah kvasinkami asimilovatelného dusíku. V rámci těchto parametrů lze stanovit intervaly, kdy během fermentace působí jako inhibitory nebo aktivátory. Mezi nejdůležitější aktivátory fermentace patří vitamíny skupiny B: thiamin (vitamín B1), kyselina D-pantothenová (vitamín B5) a pyridoxin (vitamín B6), biotin (vitamín H) a inositol. Mezi nejdůležitější minerály pro výživu kvasinek patří hořčík, sodík, draslík a vápník. Bylo zjištěno, že tyto živiny jsou obsaženy v dostatečném množství právě v hroznovém moštu. Problém nastává až během fermentace, kdy se snižuje obsah biotinu, thiaminu, inositolu a kyseliny pantothenové (Bábíková, 2010). Dalšími látkami, které jsou užívány jako aktivátory fermentace, jsou například extrakty z plísní *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium notatum* zvyšují růst kvasinek a jsou hojně vyžívány v

průmyslové výrobě etanolu a dnes i ve vinařství (Ado et al., 2009). K zlepšení růstu kvasinek v moštu přispívá také přidávek hydrolyzovaného extrakty z kvasinek, který je významným zdrojem dusíku, růstových faktorů a minerálů (Ribéreau-Gayon et al. 2006).

Inhibitory kvašení jsou látky, které snižují rychlost fermentace i samotnou respiraci kvasinek. Zvyšující se koncentrací etanolu se zvýší inhibice kvašení, při určitém množství etanolu dojde k úplnému zastavení probíhajícího procesu. Další významné inhibitory mohou být látky přítomné z důvodu ošetření hroznů (fungicidy a residua pesticidů) (Farkaš, 1983).

Aplikovaný SO_2 je také inhibitor, ale především pro jiné rody kvasinek než *Saccharomyces*. Inhibuje hlavně druhy s aktivnějším aerobním metabolismem, např. apikulátní a kožkotvorné kvasinky. Naopak sloučeniny obsahující měď silně inhibují růst druhu *Saccharomyces cerevisiae*, a to již při koncentracích 10 ppm. Organické fungicidy s aktivními látkami obsahující síru a chlór (jako jsou dichlorfluanid, folpet či captafol) potlačují aktivitu řady kmenů kvasinek. Anorganické fungicidy naopak žádný podstatný efekt na kvasinky nevykazují (Barba et al., 2010). Významný inhibiční vliv na průběh kvašení mají také nasycené mastné kyseliny C10 (kaprová), C8 (kaprilová), C6 (kapronová). Ovlivňují membránovou permeabilitu mikroorganismů a zamezují tranzitu látek mezi moštem a kvasinkou, kdy pak cukry obsažené v moštu nemohou být dále využity (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Dále se k inhibičním látkám řadí antivitaminy, které snižují, respektive mohou vyrušit účinek vitamínů. Dělí se na látky, které s vitamíny tvoří komplexy a které jsou svojí strukturou podobné vitamínům a enzymy, které degradují vitamíny (Farkaš, 1983).

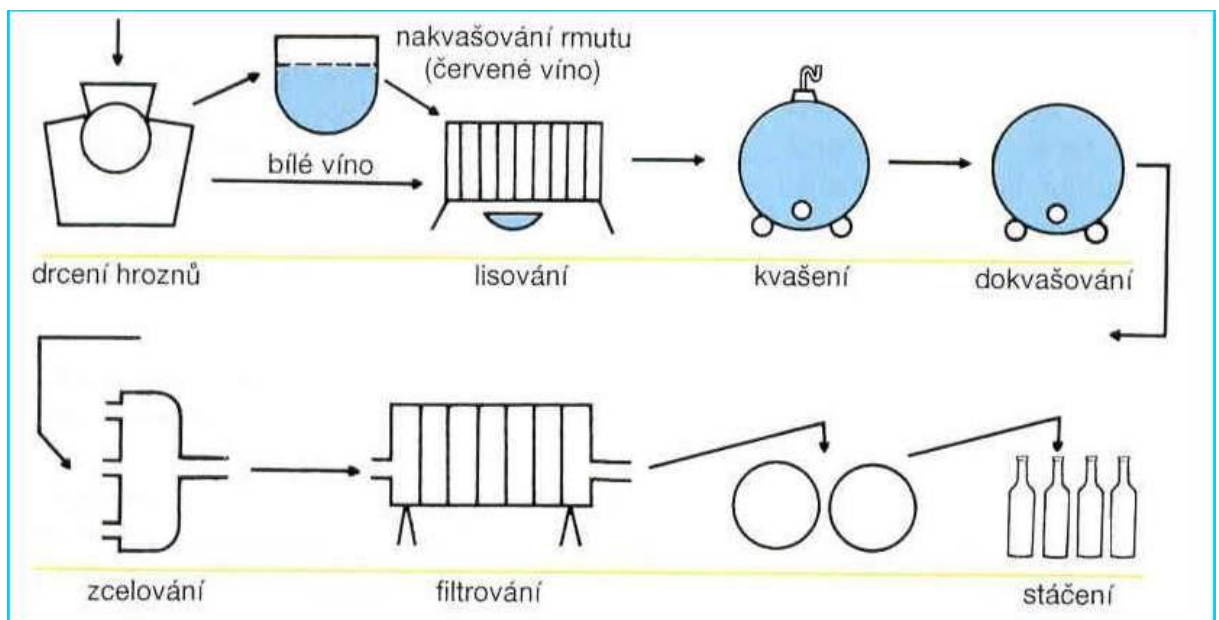
2.2 Technologie výroby vína

Zjednodušené schéma výroby vína je zobrazeno na obrázku č. 3. V této kapitole jsou stručně popsány jednotlivé technologické kroky. Vznik vína je složitý proces, do kterého promlouvá mnoho faktorů počínaje polohou vinice, přes kvalitu hroznů, technologie, použité kvasinky a zkušenosti vinaře. Základní surovinou pro výrobu vína jsou čerstvé vinné hrozny. Vinobraní je v českých podmínkách koncem srpna (velmi rané odrůdy) až konec listopadu (pozdní odrůdy). Výjimkou je sběr hroznů v zimních měsících za mrazu při výrobě ledového vína. Odrůdy révy vinné pro výrobu vína můžeme zjednodušeně rozdělit na bílé (pro výrobu bílých vín) a modré (pro výrobu červených vín).

Nejprve probíhá odzrňování hroznů (kvůli starému označení bobulí jako „zrno“). Třapiny jsou odpadem a zpravidla jsou následně použity jako hnojivo ve vinici. Odzrnění musí proběhnout šetrně, aby se nepoškodily pečičky v bobulích, ze kterých by se mohly dostávat do vína nežádoucí látky (tanin a chlorofyl). Takto oddělené bobule (resp. mošt s narušenými bobulemi) se nazývá „rmut“. Vzniklý rmut se mírně zasílí (SO_2 v dávce 25-50mg /l), aby se zabránilo činnosti nežádoucích bakterií, a nechá se u bílých vín nakvášet 2 až 24 hodin a u červených vín až několik dní (4 až 14). Nejčastěji se nakvašuje při teplotě 20 až 25 °C v závislosti na zpracovávané odrůdě. Výroba červených vín se od bílých liší tím, že se rmut lisuje až poté, co prokvasí. Tím se do rmutu vyluhují barviva, extraktivní buketní látky, které jsou uloženy ve slupce bobulí. U růžových vín se rmut z modrých hroznů nechá několik hodin uležet, aby došlo k částečnému uvolnění červeného barviva ze slupek. Poté se vylisuje a dále zpracovává jako bílé víno. Lisováním se oddělí mošt a vylisované slupky nazvané „matoliny“. Existují různé typy lisů; např. vřetenové, hydraulické či pneumatické. Výlisnost se zpravidla pohybuje od 60 do 80 %. Po vylisování se mošt odkaluje (oddělí se usazeniny – zbytky třapin, kalici látky atd.). Po odkalení je zjišťován obsah cukru v moštu. V ČR se nejčastěji používá normalizovaný moštoměr (NM). Ten udává kolik kilogramů cukru je rozpuštěno v 100 litrech moštu. Vinařský zákon povoluje přislažování řepným cukrem a to pouze u stolních a jakostních vín (u vín s přívlastkem se cukernatost zvyšovat nesmí). Pokud se cukernatost zvyšuje u červených vín, děje se to ihned po odzrnění, aby přidaný cukr kvasil spolu se rmutem. Ke zvýšení cukernatosti o 1 stupeň ČNM, musí být přidáno 1,1 kg cukru na 100 l moštu. Optimální je poměr 20-25 °NM cukru na 6-10 % obsažených kyselin. Sudy a nádoby na kvašení musí být hygienicky čisté a před naplněním jsou zasířeny oxidem siřičitým. Kvasné nádoby jsou naplněny do tří čtvrtin, protože mošt při bouřlivém kvašení pění a zvětšuje svůj objem. Kvašení může nastartovat samovolně (díky kvasinkám, které jsou již na hroznech na vinici). V konvenční produkci vína se používají speciálně selektované kmeny kvasinek. Současným trendem (zvláště u bílých vín) je chlazení kvasícího moštu tak, aby jeho teplota nepřekročila 18 – 20 °C. Při této teplotě se ve víně uchová mnohem více přírodních aromatických látek, než kdyby mošt kvasil samovolně při vyšších teplotách, a také dochází k nižšímu odparu alkoholu. Kvasící mošt se nazývá „burčák“. V případě vysokého obsahu kyselin, zejména jablečné, která způsobuje drsnou chuť, jsou použity bakterie, které kyselinu jablečnou přemění na "neagresivní" kyselinu mléčnou a oxid uhličitý. Tento děj se nazývá biologické odbourávání kyseliny jablečné a provádí se především u červených vín. Následně proběhnou operace nazvané „školení vína“, tím se rozumí proces manipulace vína od dokvašení až po přípravu k lahvování (případně prodeji jako sudové víno). Je to zejména

stáčení (oddělení vína od usazených kvasnic - dlouhodobé ležení na kalech může způsobit zhoršení jakosti vína), přídavek SO_2 , jelikož už nevzniká oxid uhličitý, který chránil mošt při kvašení vůči nežádoucím bakteriím a oxidaci. Zcelování se používá ke sjednocení a standardizování kvality podle požadavků na sensorické vlastnosti a obsah nejdůležitějších složek, zejména zbytkového cukru, koncentrace etanolu a kyselin. Dále se provádí číření vína (odstranění bílkovin a dalších nežádoucích látek). Po usazení sraženiny se víno filtruje a tím se odstraní z vína koloidní částice. Takto připravené víno se přečerpá do tanků na ležení či dubových sudů. V ležáckém sklepech dochází k vytváření buketu a k harmonickému vyrovnání sensorických vlastností – vůně a chuť se takzvaně zaokrouhluje. Délka procesu zrání je různá. Vyplývá to z odrůdy, ročníku a chemického složení vína. Bílá vína získávají optimální kvalitu již po několikaměsíčním zrání a červená nabírají své typické vlastnosti až po delším ležení (dva až tři roky) nejlépe v dubových sudech. Nové dřevěné sudy dodávají vínu další chuťové a aromatické látky (informace o technologii výroby vína byla poskytnuta vinařstvím Víno Hruška s.r.o., dostupné z <http://www.vinohruska.cz/vyroba-vina.html>).

Obr. č. 3 - Technologie výroby vína (Rychtera et al., 1987)



2.2.1 Úloha kvasinek při výrobě vín

Jak již bylo popsáno, nejdůležitější úlohu mají kvasinky v procesu produkce alkoholu. Dále mají však vliv na aroma a chuť vín. Produkci primárních a sekundárních metabolitů výrazně zasahují do kvality vína.

V první fázi fermentace, neboli během spontánního kvašení (první 2 až 3 dny) je patrný růst kvasinek, které nepatří do rodu *Saccharomyces*, jedná se zejména o kvasinky *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces beticus atd.* V terminální části fermentace (7 až 14 dní) již převládá druh *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000). Různorodost přirozeně se vyskytujících kmenů kvasinek může být odpovědná za kvalitativní rozdílnost vín a za vznik specifických chutí (Pérez-Nevado et al., 2006).

Aby se zabránilo nepředvídatelnosti fermentace, tak vinaři přidávají aktivní sušené kvasinkové kultury. Technika řízeného kvašení je enologickým standardem. Potlačení kvasinkových kultur, které nepatří do rodu *Saccharomyces* je žádoucí (výjimkou je např. australské víno Shiraz). Přidáním iniciační kultury zajistíme, že téměř veškerý cukr bude přeměněn na etanol a finální produkt bude stejnorodý (Tristezza et al., 2011).

Některé faktory silně ovlivňují alkoholickou fermentaci a v důsledku i kvalitu vína. Těmi nejdůležitější jsou klarifikace vinného moštu, úroveň oxidu siřičitého, teplota, kompozice moštu, inokulace selektivními kvasinkami a jejich interakce s ostatními mikroorganismy (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Množství jednotlivých druhů kvasinek a jejich odolnost vůči vznikajícímu alkoholu je ovlivněna teplotou. Jakékoliv teplotní změny tedy mají vliv na chemické a organoleptické kvality vína (Fleet et Heard, 1993). Torija et al. (2003) uvádí, že nízké teploty (u červeného vína kolem 15 °C) během fermentace způsobují vyšší produkci etanolu. Tvrdí také, že produkce sekundárních metabolitů (např. glycerolu) se zvyšuje se zvyšující se teplotou.

2.2.1.1 Vliv kvasinek na aroma vína

Druhové zastoupení kvasinek při fermentaci vinného moštu významně přispívá k senzorické charakteristice vína. Růst každého druhu vinných kvasinek se vyznačuje specifickou metabolickou aktivitou, která určuje koncentrace chuťových látek ve vyrobeném víně. Široké využití startovacích kultur používaných především kvůli snížení rizika zkažení a nepředvídatelnosti vývoje fermentace, může vínu zajistit vyváženou chuť, ale může také

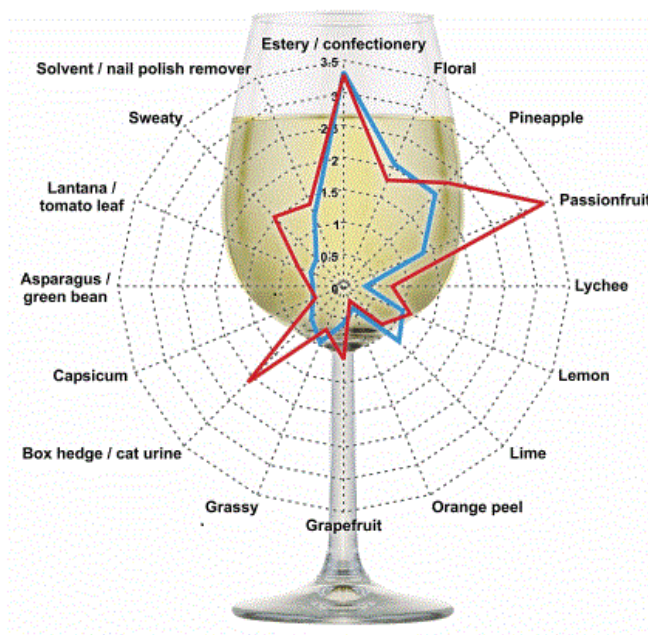
způsobit ztrátu charakteristických vůní a chutí. Takže skutečným přínosem jsou startovací kmeny kvasinek, které byly vyselektovány na základě vědecky ověřených vloh pro výrobu vín. Pro zachování regionálního charakteru vín je výhodné využívat kvasinky autochtonně se vyskytující právě v dané oblasti (Romano et al., 2003).

Jedním z nejdůležitějších faktorů, určující jakost a skutečnou hodnotu vína je jeho aroma. Dokonce i malé nuance ve výskytu těkavých látek mohou rozhodovat, zda víno bude vysoké kvality či bude-li jen běžné "stolní" víno. Jedněmi z organolepticky nejvýraznějších látek obsažených ve vínu jsou thioly, především 3-merkaptohexan-1-ol (3MH), 4-merkapt-4-methylpentan-2-ol (4MMP) a 3-merkaptohexyl acetát (3MHA) (Swiegers et al., 2006). Tyto látky pozitivně ovlivňují aroma odrudových vín Sauvignon bílý, Tramín, Ryzlink rýnský a Sylvánské zelené. Těkavé thioly se ve vinném moštu prakticky nevyskytují a vznikají pouze během fermentačního procesu. Kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* jsou odpovědné za vznik těkavých thiolů. Syntéza probíhá z netěkavých prekurzorů těchto chemických látek obsažených v moštu za působení lyas kvasinek (Darriet et al., 1995). Čím větší je koncentrace prekurzorů vonných thiolů, tím větší je koncentrace vonných thiolů ve vyrobeném vínu (Murat et al., 2001). Naopak Dubourdieu (2006) uvádí, že vinné kvasinky mají velmi omezenou schopnost syntézy daných těkavých thiolů (efektivnost využití prekurzorů je jen kolem 3 %). Jinými slovy, kvasinky nemají schopnost plně využít aromatický potenciál vinného moštu. Tím zůstává nevyužit velký zdroj aroma hroznů.

Výzkum prokázal, že množství thiolu 4MMP vzniklého během fermentace je závislé na konkrétním kmeni kvasinek, který byl použit pro kvašení (Dubourdieu et al., 2006). Zdá se tedy, že genetické a fyziologické charakteristiky určitých kmenů kvasinek mají zásadní vliv na aromatický profil vína. Výběrem správného kmene kvasinek může být pozitivně ovlivněna chuť vína (Swiegers et al., 2006).

Na obrázku č. 4 je velmi názorně vidět jak může zvolený kmen ovlivnit sensorické vlastnosti vyrobeného vína. Mošt byl fermentován 2 různými kmeny kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae* pod označením VIN13 (modrá linie) a VIN13(CSL1) (červená linie). Kmen označen VIN13 (CSL1) vykazuje zvýšenou aktivitu lyasy, která dramaticky zvýšila obsah těkavých thiolů (Swiegers et al., 2007).

Obr. č. 4 – Odlišné aromatické profily vína Sauvignon, které jsou způsobeny použitím 2 různých kmenů kvasinek (Swiegers et al., 2007)



2.3 Autochtonní kvasinky

Povrch bobulí révy vinné může být osídlen mnoha odlišnými kmeny kvasinek. Tyto kmeny se nazývají apikulární autochtonní kvasinky. Lze izolovat kmeny, které patří do rodu *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* = *S. ellipsoideus* 1, 3, 4, 6, 8, 9; *S. oviformis* 2, 5, 7; a *S. uvarum* 10) a které nepatří k rodu *S. cerevisiae*, jedná se zejména o: *Candida* spp., *Hanseniasspora* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp. a *Kluyveromyces* spp. (Andorra et al., 2011).

Množství kvasinek a jiných mikroorganismů na hroznu velmi závisí na ekologických podmínkách vinohradu (např. půdní a klimatické charakteristiky vinice). Na kvalitativní i kvantitativní složení mikroflóry mají vliv také biologické zásahy člověka, např. používání pesticidů, insekticidů nebo fungicidů na vinici. Kvasinkové populace v moštu i víně jsou ovlivněny například kontaminační mikroflórou zařízení vinařských provozoven (druhotných stanovišť), hygienou a sanitací výroby. Důsledkem kontaminace z průmyslového prostředí může být vysoký obsah kožkotvorných kvasinek ve víně. Například druhy *Hanseniasspora anomala* var. *anomala*, *Candida vini*, *Candida krusei*, *Candida pulcherrima* se často dají nalézt v plničce a vzduchu lahvovery (Farkaš, 1983).

Kvasinky, které mají nízkou fermentační schopnost (*Candida spp.*, *Hanseniaspora spp.*, *Pichia spp.*, *Rhodotorula spp.* and *Kluyveromyces spp.*) jsou ve vinném moštu během spontánního kvašení dominantní. Následně je výskyt těchto kvasinek potlačen druhem *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000). Avšak Mills et al. (2002) uvádí, že při použití přímé molekulární metody (sekvenování fylogenetických markerů), objevil aktivní populaci rodu *Hanseniaspora* během celého fermentačního procesu. Zjistil také, že pomocí kultivačních metod nebyli schopni tento rod zaznamenat. Některé rody autochtonních kvasinek se projevují jako vhodné kultury pro výrobu vína. Existují tedy tendence k jejich komerčnímu využití ve vinařství. Bylo prokázáno, že obohacují aromatický profil vína (Capece et al., 2005). Druhy *Hanseniaspora guilliermondii* a *Hanseniaspora uvarum* společně se startovací kulturou *Saccharomyces cerevisiae* byly testovány během několika fermentačních pokusů. Prezentované výsledky této studie poukázaly na fakt, že růst přirozeně se vyskytujících kvasinek během prvních několika dní zvýšil produkci žádoucích látek, jako jsou například estery. Bylo zjištěno, že kultura *H. guilliermondii* ve vinném moštu velmi zvýšila hladinu 2-fenyletylacetátu, zatímco *H. uvarum* zvýšila hladinu isoamylacetátu. Oba zmíněné estery jsou žádoucí v bílých vínech. Ester 2-fenyletylacetát vytváří ve vínu aroma růží a ovoce a ester isoamylacetát vytváří aroma banánů a hrušek (Moreira et al., 2008). Naopak Furdíková et al. (2010) uvádí, že nevýhodou fermentace pomocí apikulárních autochtonních kvasinek (jako např. rod *Hanseniaspora*) může být odlišná kvalita vyrobeného vína v různých letech. Proto jsou nejčastěji používány tzv. startovací kultury *S. cerevisiae*. Aplikace kvasinek s definovanými vlastnostmi umožnila opustit od nepředvídatelného fermentačního procesu a zavést biologicky regulovatelné technologické procesy výroby vína.

Čisté kultury kvasinek, které se označují jako aktivní sušené vinné kvasinky (ASVK) se ve vinařství využívají už takřka padesát let. Od sedmdesátých let dvacátého století jsou běžnou součástí vinařské praxe. Současná výroba má k dispozici několik desítek komerčních preparátů ASVK. Většina těchto kmenů pochází ze zahraničí (Německo, Francie, Itálie, Kanada, Austrálie, Jihoafrická republika) a jsou to produkty špičkových světových laboratoří. Tyto kmeny mají nepochybně vynikající technologické vlastnosti, ale jejich univerzální použití ve vinařství pozměňuje charakter vína typický pro každou vinohradnickou oblast a vína tak působí uniformně (Furdíková et al., 2010).

Odrůdy révy vinné vysázené na základě dlouhodobých zkušeností vinohradníků přinášejí plody, které v sobě nesou jak pečeť konkrétního kraje (terroir), tak i určité odrůdové pojmenování. Univerzální aplikace kmenů ASVK však způsobuje, že se do moštu dostávají mikroorganismy, které pochází nejen z jiné vinohradnické oblasti, ale dokonce z jiného

kontinentu. Je naprosto běžné, že se malokarpatské mošty fermentují jihoafrickými či italskými kvasinkami. O terroir, v souvislosti s komerčními kmeny ze zahraničí, tedy není možno vůbec hovořit (Ďurčanská et al., 2010). Řešením jak dokonale zachovat originalitu a zároveň kvalitu vína je aplikace definovaných kmenů kvasinek, které pochází ze stejné oblasti jako bobule určené na výrobu vína. Autochtonní kvasinky jsou přirozenou součástí mikroflóry dané lokality. Bylo prokázáno, že v různých vinicích jsou zastoupené různorodé kmeny rodu *Saccharomyces cerevisiae* a dominantní kmen bývá pro každou odrůdu jiný (Furdíková et al., 2010). Každá vinohradnická oblast má charakteristické kvalitativní a kvantitativní zastoupení rodů a kmenů kvasinkových kultur a autochtonní kvasinky jsou tak geograficky jedinečné. Použití selektovaných autochtonních kmenů *S. cerevisiae* s přesně definovanými a technologicky vyhovujícími vlastnostmi, přináší výhody regulovaného kvašení pomocí čisté kultury a současně přispívá k zachování originality vína – terroir (Ďurčanská et al., 2010).

2.3.1 Izolace a selekce autochtonních druhů

Před začátkem procesu izolace autochtonních kvasinek *S. cerevisiae* je rozhodující vybrat vinice bez kontaminace komerčními kmeny vinných kvasinek. Kultury kvasinek je nutné přesně identifikovat na úroveň rodu, druhu a kmene, protože primárním kritériem pro výběr čistých kultur je příslušnost kmene k druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Jednotlivé kmeny je následně nutné charakterizovat, ověřit jejich technologické vlastnosti a vybrat jen kmeny s vhodnými charakteristikami. Vybrané kmeny s nejvhodnějšími technologickými vlastnostmi je nutné ověřit též v praxi při reálné výrobě vína. Při aplikaci autochtonních kmenů se musí zachovávat princip terroir – surovina (bobule) a kmen kvasinek určený na jeho fermentaci mají shodný geografický původ. Až po první skutečné aplikaci kmene, chemické a sensorické analýze vyrobeného vína je možné s jistotou prohlásit, že je kmen na výrobu konkrétního vína vhodný (Furdíková et al., 2010). Abychom se vyhnuli pochybné nebo nesprávné identifikaci, používají se genetické metody, které jsou přesnější než kultivační. Tyto metody jsou např. RFLP - metoda polymorfismu délky restrikčních fragmentů, PCR - metoda polymerázové řetězové reakce. Tyto identifikační nástroje jsou rutinně používány pro identifikaci kvasinkových mikroorganismů izolovaných z potravin (Guillamón et al., 1998).

Při dodržení standardních laboratorních podmínek kultivace se transkripční profil autochtonních vinařských a laboratorních kmenů kvasinek velmi výrazně odlišuje v transkripci několika málo genů, kterým jsou přičítány vlastnosti vinařských kvasinek

(tolerance vysokého obsahu alkoholu a jednoduchých sacharidů, atd.). Bylo dokázáno, že autochtonní kmeny jsou mnohem více „kolonizovány“ transposony než kmeny laboratorní. Transposony by mohly být použity jako vhodný marker pro rozlišení využívaných kmenů na molekulární úrovni (Hauser et al., 2001). Jak uvádí Capece et al. (2005) mnoha studiemi byl zjištěn velký přínos těchto uvedených molekulárních metod, které jsou podle něj relevantní pro identifikaci kvasinek ze zákvasů.

2.3.2 Použití selektovaných autochtonních kvasinek pro výrobu vín

První výroba vína pomocí autochtonních kmenů *S. cerevisiae* izolovaných týmem profesora Malíka se uskutečnila v roce 2006 ve vinařství Znovín Znojmo, a.s. Byly izolovány dva kmeny rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Kmen Stošíkovice SG byl izolován z viniční trati U tří dubů a byl použit na výrobu odrůdového vína Sauvignon. Druhým izolovaným kmenem byl kmen Stošíkovice RR, který byl izolován také z viniční tratě U tří dubů a byl použit na výrobu odrůdového vína Ryzlink rýnský v moravské vinařské společnosti. Vznikly tak dvě vína – Ryzlink rýnský Terroir Levure a Sauvignon Terroir Levure. Obě vína prokázala na trhu svoji životaschopnost a Znovín Znojmo, a.s. s aplikací autochtonních kultur pokračuje i v dalších ročnících. Po roce následovala příklad Znovína další moravská společnost Sonberk a.s., Popice, která v praxi využívá pět autochtonních kmenů *S. cerevisiae*. První „kompletně“ terroir vína Sauvignon a Ryzling rýnský s označením „Original Yeast“, vyšla v ročníku 2007 a hned měla úspěch. V roce 2007 byly aplikované do praxe i další kmeny, a to na výrobu vín Račianského vinohradnického spolku v Bratislavě. V roce 2008 se začalo s aplikací autochtonních kmenů v moravském vinařství Josefa Valihraha, čímž v Krumvíři vznikla originální (autentická) vína Chardonnay, Pálava a Ryzlink rýnský. Karpatská Perla, spol. s. r.o. aplikovala v roce 2008 dva autochtonní kmeny a v edici Varieto tak na trh přišlo víno Devín s označením „Originálne kvasinky“. V roce 2009 se v této společnosti autochtonní kmeny *S. cerevisiae* nepoužily jen na výrobu suchých vín, ale i na výrobu ledového vína Pálava (Ďurčanská et al., 2010).

2.4 Autentické víno

Autentická vína se vyrábějí podle určitých zásad, které splňují dodržení skutečné autenticity vína. Mezi vínem vyrobeným za použití selektovaných autochtonních kvasinek a „autentickým vínem“ je rozdíl v tom, že pro výrobu „autentického vína“ nebyly použity selektované kvasinky. Je kladen důraz na využití místních zdrojů (včetně rozmanitých druhů autochtonních kvasinek) z jednoho určitého vinohradu. Vinná réva by se měla pěstovat v ekologickém režimu dle pravidel platných pro biodynamickou či bio produkci. V rámci systému ošetřování vinic se nepoužívají systémové pesticidy (insekticidy, fungicidy, herbicidy ani akaricidy). Bobule musí být zpracovávány co nejšetrněji. Fermentace autentických vín probíhá spontánně díky apikulátním autochtonním kvasinkám z bobulí a také kvasinkám přítomným v rámci sklepního zařízení. Do procesu nejsou přidávány enzymy ani taniny. Autentická jsou běžně vyráběna podle tradičních způsobů, jakými vína vyráběli naši předci. Kvasí v sudech (bílé odrůdy), nebo ručním mestováním (ponožování a rozbíjení horní vrstvy slupek) rmutu v otevřených kádích (červené odrůdy). K výrobě někteří vinaři dokonce používají i velké kameninové nádoby, které se již nepoužívají několik set let. Výsledný produkt po skončení fermentace není čeřen ani filtrován. Víno se nechá přibližně jeden rok „ležet“ na kvasech. Oxid siřičitý či jiná antioxidační činidla se smí použít jen při stáčení vín do nerezových nebo skleněných nádob. Pokud jsou splněny všechny požadavky, víno smí být označené značkou „A“, která se umísťuje na hrdle láhve (viz obr. č. 5). Produkovaná vína ovlivňuje i opouštění tradičních, svažitých viničních tratí, které bývají substituovány rovinnějšími polohami, kde se réva nikdy v minulosti nepěstovala. Důsledkem těchto praktik je jiná kvalita vína, ale také zarůstající úbočí, jejichž vinohrady po celá staletí dotvářely genia loci jihomoravské krajiny (dostupné z <http://www.autentiste.cz/>).

2.4.1 Autentisté

Jako Autentisté se označují vinaři, kteří založili spolek tuzemských vinařů, který se zabývá výrobou „autentického vína“ z lokálních zdrojů (podrobnější informace o spolku Autentisté jsou dostupné na <http://www.autentiste.cz/>). Pokud vinař splní požadavky „autentického vína“ smí být označeno značkou „A“, která se umísťuje na hrdle láhve (viz. obr. č. 5). Hlavním cílem Autentistů podle vinaře Richarda Stávka je „Vino, v němž se co nejjímavěji odráží duch místa zachycený osobitou rukou vnímavého vinaře“.

Základní pravidla závazná pro členy sdružení Autentisté:

Ve vinohradě:

1. Upřednostňují se postupy pěstování révy zohledňující principy ekologického zemědělství
2. Vylučují se veškeré herbicidy
3. Vylučují se veškeré syntetické insekticidy a akaricidy
4. Vylučují se systémové fungicidy a ošetřovat je možno pouze ochrannými prostředky a pomocnými látkami schválenými pro biologické vinohradnictví
5. Zakazuje se aplikace syntetických hnojiv
6. Upřednostňuje se výsadba a pěstování autochtonních a tradičních středoevropských odrůd nebo odrůd umožňující uplatnit v pěstování révy výše uvedené postupy
7. Stanovuje se minimální počet 5000 jedinců na hektar při nových výsadbách
8. Maximální výnos z hektaru nesmí překročit 50 hl
9. Jelikož jsou autentická vína viny rukodělnými, vylučuje se jiný než ruční sběr
10. Cílem je zvyšovat dlouhodobou úrodnost a biologickou aktivitu půdy

Ve sklepě:

1. Vylučují se veškeré geneticky modifikované organismy a aditiva s jejich použitím vyrobená. Při výrobě se upřednostňují biologické, fyzikální a mechanické postupy před chemickými. Vylučuje se však flotace. Cílem je chránit životní prostředí, minimalizovat spotřebu energie a tvorbu odpadů
2. Vylučují se veškeré selektované kvasinky. Mošty kvasí spontánně pomocí autochtonních mikroorganismů přítomných na hroznech a ve sklepě
3. Vylučují se všechny cizorodé produkty jako umělá výživa pro kvasinky, přidané enzymy či bakterie, při vinifikaci se může použít pouze oxid siřičitý, případně bentonit a čerstvý bílek
4. Zakazuje se zahušťování moštů pomocí reverzní osmózy etc.
5. Zakazuje se přidávání taninů do červených i bílých vín
6. Upřednostňuje se fermentace a zrání v dřevěných, keramických či skleněných nádobách
7. Vylučuje se ostrá filtrace vín
8. Veškerý SO₂ v suchých bílých vínech nemá překročit 100 mg/l, u červených 80 mg/l
9. Platí zákaz odkyselování (přikyselování) a zvyšování alkoholu pomocí sacharosy

Obr. č. 5 - Logo „autentického vína“ (dostupné z <http://www.autentiste.cz/>)



2.5 Terroir

Terroir je spolupůsobení charakteristik místa, které jsou dány vlivy podloží, půdy, počasí, vody a také autochtonních mikroorganismů (např. plísní a kvasinek). Některé definice uvádějí i vliv lidského faktoru (výběr odrůdy, vinohradnické techniky a také výběr čistých kultur kvasinek pro následnou řízenou fermentaci). Myšlenka charakterizující terroir vznikla na základně francouzského "Appellation d'origine contrôlée" (AOC). Tento systém byl vzorem pro vytvoření právních předpisů týkajících se produkce vína po celém světě. Rozsah vlivu, který skutečně terroirní charakteristika má na konkrétní víno, je stále kontroverzní (Robinson, 2006).

2.6 Region VOC Modré Hory

Vína originální certifikace (VOC) jsou specifická tím, že hrozny, ze kterých jsou tato vína vyrobena, pocházejí výlučně z vinic ležících ve schválených polohách daného regionu. Vinaři sami vyberou vinařské trati, které jsou pro výrobu VOC nejvhodnější. Tento přísný výběr poloh s originálním půdním složením dává vínům jedinečné vlastnosti. Do systému VOC jsou zařazeny nejtypičtější odrůdy daného vinařského regionu. Vinaři sami si v rámci sdružení vína hodnotí, ověřují původ hroznů a charakter vyráběných vín.

Označení vín VOC existuje souběžně s tzv. germánským systémem dělení vín na jakostní, jakostní s přívlastkem atd. Označení VOC je obdobou apelačních systémů užívaných v jiných vinařských zemích, jako je Francie (AOC), Itálie (DOC) či Rakousko (DAC).

Zatímco germánský systém vyvozuje kvalitu vína především z cukernatosti hroznů, apelační (románský) systém se soustředí na představení maximálních možností dané odrůdy v místě jejího pěstování. Dne 10. 5. 2011 bylo Ministerstvem zemědělství Občanskému sdružení Modré Hory uděleno povolení přiznávat označení VOC. Po splnění všech zákonem daných podmínek tak bylo uděleno první VOC v České republice, které bude vyrábět VOC vína pouze z modrých odrůd révy vinné. Vinaři regionu zvolili tři nejpěstovanější tradiční odrůdy: Frankovka, Svatovavřínecké a Modrý Portugal. Z těchto odrůd jsou dnes uváděna na trh červená vína po 18 měsíčním zrání a mladá rosé vína. Vzniklo tedy zajímavé doplnění ke stávajícímu VOC Znojmo, které je založeno na třech odrůdách bílých a VOC Mikulov, které zahrnuje odrůdy bílé i modré. Občanské sdružení VOC Modré Hory momentálně sdružuje vinaře z pěti vymezených obcí. Jedná se o obce Bořetice, Kobylí, Němčičky, Velké Pavlovice, Vrbice. Tyto obce jsou spolu historicky spjaté společnou socioekonomickou sférou. Oblast tohoto regionu je velmi kopcovitá. Vinice se táhnou až k samým okrajům Ždánického lesa, kde se dobře daří právě modrých odrůdám, které v těchto půdách nalézají také vysoké obsahy vápníku a hořčíku. Tyto prvky jsou důležité pro dokonalé dozrání hroznů. Nadmořská výška vinic se pohybuje průměrně od 200 do 300 m. n. m. Tento region je odbornou vinařskou veřejností chápán jako srdce pěstování modrých hroznů v České republice, založení VOC postaveného na modrých odrůdách tedy bylo nasnadě. Myšlenku vzniku VOC podpořil také Prof. Vilém Kraus, CSc., který je tvůrcem názvu „Modré hory“. Na tomto území poté vznikl Dobrovolný svazek obcí Modré hory, který pomocí jednotlivých sdružených obcí podporuje propagaci území. Byl tak dán základ vinařské turistiky tohoto VOC regionu. Myšlenku VOC na tomto území začal v roce 2007 kultivovat Ing. Jan Stávek, Ph.D., jeden ze zakládajících členů a současný předseda o. s. VOC Modré Hory. Z dalších zakládajících členů občanského sdružení je možné jmenovat např. Vinařství Jedlička a Novák Bořetice, Vinařství Sedláček Vrbice, Vinařství Lacina Velké Pavlovice nebo Patria Kobylí. V současné době může vína VOC Modré Hory produkovat pouze 20 vinařů ze 130 ha vybraných vinic (Dostupné z <<http://www.vocmodrehory.cz/>>).

3 Hypotéza

Vinné kvasinky se v přírodě nachází na povrchu vinné révy i v půdě pod rostlinami. Vinaři nejčastěji používají aktivní sušené kvasinky, které nejsou pro danou oblast produkce původní a mají univerzální využití. Bohužel pozměňují charakter vína typický pro jednotlivé vinohradnické oblasti a vína tak často působí uniformně.

Byla stanovena hypotéza, že kmeny, izolovány z vinohradů VOC Modré Hory, budou mít jiné vlastnosti oproti komerčnímu kmeni. Dále jsme předpokládali, že autochtonní kvasinky vyizolované v této práci budou vykazovat variabilní fermentační schopnosti při kvašení různých vinných moštů. Další hypotézou bylo, že na vinohradu bude pestřejší druhové složení a nebudou izolovány pouze kmeny druhu *Saccharomyces cerevisiae*, které se výhradně využívají jako startovací kultury. V rámci souboru testovaných kvasinek bude variabilita ve fermentační schopnosti. Kultury mohou obohatit pestrost produkovaných vín z dané vinařské oblasti.

4 Cíl práce

Autochtonní kvasinky představují nový rozměr v produkci originálních (terroirních) vín. Izolace, testování a následné použití původních kvasinek již dnes patří mezi slibné praktiky k dosažení pestřejší palety vín, které vynikají svými specifickými vlastnostmi.

Cílem této diplomové práce bylo porovnání vlastností a fermentačních aktivit u kmenů kvasinek vyizolovaných z vinařského regionu VOC Modré Hory při kvašení moštů z různých odrůd révy vinné. Kvasinky byly identifikovány a charakterizovány pomocí biochemických a molekulárně-biologických metod.

5 Materiál a metody

V experimentální části diplomové práce byly použity autochtonní kvasinky izolované z přirozených zákvasů z různých viničních tratí regionu VOC Modré Hory. Kvasinky byly charakterizovány a identifikovány pomocí souprav firmy bioMérieux určených pro kvasinky. Pro dosažení přesnější identifikace byly kmeny analyzovány molekulárně genetickou metodou rep-PCR. Následně byly vybrané kmeny zaočkovány do vinných moštů různých odrůd vín. Po ukončení fáze bouřlivého kvašení byl stanoven obsah alkoholu a zbytkového cukru v moštu.

V tomto experimentu bylo použito 34 vyizolovaných kmenů autochtonních kvasinek ze 7 různých viničních tratí (seznam je uveden níže) v rámci jednoho vinařského regionu VOC Modré Hory. Z každé viniční tratě byly kmeny izolovány pomocí Malt Extract agaru (Oxoid).

Viniční tratě, ze kterých byly odebrány vzorky (nadmořská výška):

Bočky (270 m. n. m.)

Kolberk (280 m. n. m.)

Novosádky (230 m. n. m.)

Růžový (242 m. n. m.)

Staré Hory (232 m. n. m.)

Veselý (245 m. n. m.)

Zbavce (261 m. n. m.)

5.1 Charakterizace a identifikace kvasinek pomocí

biochemických souprav

Fermentační profily izolovaných kmenů byly analyzovány za použití dvou identifikačních kitů: API ID 32 C a API 20 C AUX. Pro identifikaci kmenů autochtonních kvasinek na základě analyzovaných fermentačních profilů byl použit identifikační software APIWeb (bioMérieux).

Následně byly testovány enzymatické aktivity u jednotlivých kmenů. Byl použit kit API ZYM od firmy bioMérieux. Při použití biochemických souprav bylo postupováno podle pokynů výrobce.

5.1.1 Identifikační kit API 20 C AUX

Kvasinky byly očkované do 20 jamek testu. Fotografie testu je vidět na obrázku č. 6. Inokulum bylo připraveno tak, aby byl zákal suspenze odpovídající 2. stupni zákalové stupnice McFarlanda. Test byl inkubován 48 hodin při teplotě 30 °C. Po 48 hodinách kultivace byl porovnán růst v každé jamce s jamkou standardu. Výsledky byly zaznamenány a následně vyhodnoceny pomocí softwaru APIWeb (přes webové rozhraní).

Obr. č. 6 - API 20 C AUX (dostupné z <http://www.biomerieux-industry.com>)



5.1.2 Identifikační kit API ID 32 C

Tato metoda je velmi podobná metodě předešlé, obsahuje však o 12 jamek se substráty více (32). Do jamek se substráty připraveného testovacího proužku byla nanášena suspenze kvasinek odpovídající 2. stupni zákalové stupnice McFarlanda. Fotografie testu lze vidět na obrázku č. 7. Inkubace probíhala 48 hodin při teplotě 30°C. Po 48 hodinách byla aktivita jednotlivých kmenů vyhodnocena a následně byly tyto kmeny identifikovány počítačovým programem APIWeb.

Obr. č. 7 - API ID 32 C (dostupné z <http://www.biomerieux-industry.com>)



5.1.3 Identifikační kit API ZYM

Pro enzymatické testování touto metodou bylo vybráno 23 kmenů na základě předešlých identifikačních testů a 1 komerční kmen jako srovnávací vzorek. API ZYM je mikrometoda určená k zjištění enzymatických aktivit mikroorganismů. Testovací proužek obsahuje 19 testovacích jamek se substráty a 1 kontrolní jamku standardu. Na obrázku č. 8 je fotografie tohoto testu. Inokulum bylo připraveno tak, aby odpovídalo 5. stupni McFarlanda. Do každé jamky testu byla napipetována suspenze kvasinek. Inkubace připravených testovacích proužků probíhala 4 hodiny při teplotě 37 °C. Na závěr byly do každé jamky přidány reagenty ZYM A a ZYM B. Po uplynutí 10 minut od aplikace reagentů byly, na základě barevných změn, výsledky vyhodnoceny.

Obr. č. 8 - API ZYM (dostupné z <http://www.biomerieux-industry.com>)



5.2 Molekulárně genetické metody

5.2.1 Izolace DNA kvasinek pro PCR

Pro PCR analýzu bylo vybráno 22 kmenů, u kterých se výsledky biochemických testů nejvíce lišily. Aby bylo možné analyzovat DNA, bylo nejprve třeba vyizolovat DNA z vybraných kmenů. Do 2 ml eppendorfky byl napipetován 1 ml narostlé kultury a následně byl na 2 minuty centrifugován při otáčkách 14 500 za minutu. Vzniklý supernatan byl odstraněn a k sedlině bylo přidáno 100 µl PrepManUltra (Applied Biosystems). Takto vzniklý vzorek byl protřepán po dobu 30 sekund. Vzorky byly umístěny do termobloku při teplotě 100 °C na 10 minut. Dále byl obsah zkumavek ochlazován při pokojové teplotě po dobu 2 minut a následně ještě jednou centrifugován. Na závěr bylo 50 µl supernatanu pipetováno do

jiné označené eppendorfky. Identifikace v rámci této práce byla založena na metodě amplifikace repetitivní sekvence genů.

5.2.2 rep-PCR

Metoda rep-PCR (repetitive sequence-based PCR) je založena na vyhodnocení PCR produktů získaných pomocí primerů komplementárních ke krátkým repetitivním sekvencím, které se vyskytují v genomech mikroorganismů. Izolovaná DNA z kvasinkových kultur byla amplifikována pomocí rep-PCR za použití primeru (GTG)₅ (5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'). PCR produkty byly elektroforeticky rozděleny na 1,5% agarosovém gelu.

Reakční směs pro PCR byla vytvořena takto:

- 1) 10,5 µl deionizované vody (Water nucleotic free)
- 2) 12,5 µl PCR mixu (Dream Taq Green master mix)
- 3) 1 µl primeru
- 4) 1 µl DNA

Vzorky s reakčními směsmi byly umístěny do termocykléru. Údaje o procesu probíhající v termocykléru jsou zaznamenány v tabulce č. 1.

Tab č. 1 - Program termocykléru

Proces	teplota (°C)	čas (min)	Počet cyklů
Počáteční denaturace templátové DNA	95	7	1
Denaturace	90	3	45
Hybridizace	40	1	
Elongace	65	8	
Závěrečná elongace	65	16	1

5.2.3 Gelová elektroforéza

K elektroforetické separaci byl použit 1,5% agarosový gel tvořený 100 ml TAE pufru (0,75 x koncentrovaný) v němž bylo rozpuštěno 1,5 g agarosy. Do gelu byl přidán roztok (Gel Red Nucleic Acid; Biotium) pro vizuální detekci fragmentů DNA. Následně byl gel nalit do připravené elektroforetické vany opatřené hřebínkem pro tvorbu jamek na vzorky. Po zatuhnutí byl na gel nalit TAE pufr a do vzniklých jamek bylo pipetováno 2 x 11 vzorků a 2 x velikostní marker. Poté byla elektroforéza spuštěna. Elektroforetická separace probíhala pod stálým napětím 80 V jednu hodinu a padesát minut. Nakonec byl gel vložen do vizualizačního zařízení Biorad, prosvícen UV zářením a zachycen pomocí softwaru Quantity One.

5.3 Testy fermentačních schopností vybraných kvasinek

Testy fermentačních schopností jednotlivých druhů kvasinek v různých odrůdových moštích o rozdílné cukernatosti byly použity pro zjištění výtěžnosti etanolu, zbytkového cukru a obsahu metanolu. Každý mošt měl různý obsah přítomných jednoduchých sacharidů.

5.3.1 Použité odrůdy a jejich cukernatost

Byly použity odrůdy ze dvou různých lokalit:

- 1) Vinařská oblast Mělník
- 2) Vinařská oblast Karlštejn

Seznam použitých odrůd na výrobu moštů a lokalit odkud hrozny pocházely je uveden v tabulce č. 2. U každé z odrůdy byla provedena pasterace, pro zajištění čistoty kvašení bez přirozeně se vyskytujících mikroorganismů ve vylisovaném moštu. Následně byla změřena cukernatost u každého moštu pomocí refraktometru. Žádný z moštů nebyl dodatečně doslazován ani nebyla přidána žádná aditiva, která by ovlivnila průběh fermentace.

Tab. č. 2 - Použité odrůdy na výrobu moštů

Název moštu	Lokalita
Muškát	Mělník
Semling	Mělník
Tramín červený	Mělník
Sv. Vavřinec	Mělník
Dornfelder	Mělník
Hibernal	Mělník
Müller Thurgau	Mělník
Modrý Portugal	Karlštejn
Dornfelder	Karlštejn
Směs odrůd	Mělník

5.3.2 Příprava moštů

Nejprve byly bobule omyty vodou pro odstranění potenciálních zbytků postřiků, které by mohly ovlivnit průběh fermentace. Následně byly bobule rozemnuty a přes plátno vylišován surový mošt. Každý mošt bylo nutné pasterovat, zchladit a změřit refraktometricky obsahy cukru. Celkový počet připravených vzorků vychází z množství použitých moštů a vybraných autochtonních kvasinek. Bylo vybráno 10 různých moštů a 8 kmenů kvasinek. Celkový počet vzorků činil tedy 80. Použitý objem vzorkovnic byl 100 ml a bylo dávkováno 50 ml odrůdového moštu do každé ze vzorkovnic.

5.3.3 Refraktometrické měření cukrů

Pro měření cukernatostí moštů a výsledných kvasů byl použit refraktometr RWN10 – ATC, určený speciálně pro vinařské účely. Bylo počítáno se stupnicí Brix, kde 1 stupeň °Bx znamená 1 % rozpuštěného jednoduchého cukru v roztoku. Stupnice refraktometru je diferenciována na desetiny stupňů °Bx.

5.3.4 Použité kvasinky

Bylo použito sedm vybraných kmenů izolovaných ze sedmi různých viničních tratí z vinařské obce Němčičky v regionu VOC Modré Hory. Z každé viniční trati byl použit jeden kmen. Pro srovnání byl také testován jeden komerční kmen běžně dostupný ve vinařských prodejnách. Seznam vybraných kmenů pro fermentační experiment je zaznamenán v tabulce č. 3.

Tab č. 3 - Kmeny použité pro testování fermentačních schopností

Použité kmeny pro fermentace
Bočky 4
Kolberk 3
Novosádky 5
Růženy 4
St. Hory 1
Veselý 2
Zbavce 1
Komerční kmen

5.3.5 Fermentace

Každý testovaný kmen byl kultivován na Malt Extract agar (Oxoid) a poté byla připravena kvasinková suspenze pro zaočkování moštů. Stěr kultury z kultivační Petriho misky byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku. Pro kmen bylo dosaženo hodnoty turbidimetrie 8,2. Do každé vzorkovnice obsahující 50 ml vinného moštu bylo zaočkováno 0,1 ml kvasinkového média. Vzorkovnice byly umístěny do termostatu při teplotě 24 °C za nepřístupu světla.

První vzorky z fermentačního procesu byly odebrány po 7 dnech, a to po skončeném primárním (bouřlivém) kvašení. Další vzorky pro analýzu obsahu alkoholu a cukrů byly odebrány po 15 denní fermentaci.

5.3.6 Analytické metody použité pro vyhodnocení

5.3.6.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda, kde se od sebe oddělují složky obsažené ve vzorku. Uplatňuje se pro organické, lehce zplynitelné látky, které nedegradují vysokou teplotou. Stacionární fáze interaguje s unášenými složkami vzorku, které jsou unášeny mobilní plynnou fází. Některé sloučeniny se tedy při pohybu zdržují. Nejdříve jsou detekovány složky, které méně interagují se stacionární fází a postupují tak kolonou rychleji. V této diplomové práci bylo analyzováno plynovou chromatografií 80 vzorků na obsah etanolu a metanolu po 7 dnech fermentace.

Nejprve byla sestavena ředící řada standardů, na jejímž základě byla vytvořena kalibrační křivka. Závislost koncentrace analytu standardů a analytického signálu byla lineární. Rozmezí zvolených standardizovaných koncentrací pokrývalo celý rozsah stanovovaného analytu. Do vialek pro standardy bylo aplikováno 0,5 ml standardu o požadované koncentraci etanolu či metanolu a byly doplněny 0,5 ml roztoku interního standardu (1% roztok aceton-nitrilu) ke zpřesnění analýzy. Standardy s etanolem byly připraveny v koncentracích 1%, 2%, 5%, 10%, 20% (etanol v hmotnostních procentech a destilovaná voda). Standardy metanolu v destilované vodě též vyjádřené v hmotnostních procentech: 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%. Do každé z 80 vialek pro vzorky bylo napipetováno 0,5 ml příslušného vzorku a doplněno 0,5 ml výše zmíněného roztoku interního standardu.

Připravené vzorky byly analyzovány plynovým chromatografem Agilent 6890N s autosamplérem, který je zachycen na obrázku č. 9. Detekované hodnoty byly zaznamenány a přepočteny programem Agilent ChemStation.

Obr. č. 9 - Plynový chromatograf Agilent 6890N (dostupné z <http://www.agilent.com>)



6 Výsledky

Kvasinky testované v této práci byly izolovány z rozkvašeného vinného moštu pocházejícího z VOC Modré Hory během fáze bouřlivého kvašení pomocí Malt Extract agaru (Oxoid). Bylo izolováno celkem 34 kmenů kvasinek. Vybrané kmeny byly charakterizovány enzymatickými a fermentačními testy. Charakterizace byla provedena pomocí 3 odlišných typů mikrotestů od firmy bioMérieux. Na základě těchto charakteristik byly kmeny identifikovány pomocí počítačového programu APIWeb (bioMérieux) přes webové rozhraní. Pro zpřesnění identifikace byly kmeny analyzovány molekulárně-biologickou metodou rep-PCR. Dále byly vybrané kmeny kvasinek testovány na schopnost prokvasit různé mošty o přirozených koncentracích jednoduchých cukrů. Bobule pro zákvas pocházely ze dvou geografických lokalit v České republice. Jeden vybraný kmen z každé viniční tratě a jeden komerční kmen byly vybrány jako startovací kultury.

6.1 Vyhodnocení enzymatických a fermentačních mikrotestů

6.1.1 API 20 C a API ID 32 C

Výsledky identifikace kvasinek na základě biochemických testů jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tab. č. 4 - Výsledky fermentačních mikrotestů API 20 C AUX a API ID 32 C (bioMérieux)

Lokalita	Počet kmenů	Souprava API 20 C	Souprava API ID 32 C
		Identifikovány jako	Identifikovány jako
Bočky	6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 6x	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 6x
Kolberk	5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4x	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5x
		<i>Candida pelliculosa</i> 1x	
Novosádky	5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5x	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5x
Růžový	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4x	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4x
St. Hory	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 3x	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 3x
		<i>Candida utilis</i> 1x	<i>Candida colliculosa</i> 1x
Veselý	6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5x	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 6x
		<i>Pichia angusta</i> 1x	
Zbavce	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4x	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4x

Při použití identifikační soupravy API 20 C AUX bylo 31 z 34 testovaných kmenů identifikováno jako *Saccharomyces cerevisiae* s průměrným stupněm spolehlivosti identifikace 97,45 % a s průměrnou hodnotou T-indexu 0,886 (čím se hodnota více blíží 1, tím je výsledek testu spolehlivější). Stupeň spolehlivosti identifikace se pohyboval od 66,70 % do 99,80 %. Kmeny, které podle této identifikace nepatří k druhu *S. cerevisiae*, byly identifikovány zpravidla s menším stupněm spolehlivosti a to jako *Candida pelliculosa* (Kolberk 1), *Candida utilis* (St. Hory 2) a *Pichia angusta* (Veselý 5). Hodnota T-indexu, která vyjadřuje spolehlivost testu, se pohybovala od 0,63 do 1,00.

Z 34 kmenů testovaných soupravou API ID 32 C bylo 33 kmenů identifikováno jako *S. cerevisiae* s průměrným stupněm spolehlivosti 99,73 % a s průměrným T-indexem 0,894. Podle výsledků této identifikační soupravy byl určen kmen St. Hora 1 jako *Candida colliculosa*. Všechny ostatní analyzované kmeny byly identifikovány jako *Saccharomyces cerevisiae*. Hodnota T-indexu se v tomto testu pohybovala od 0,33 do 1,00.

6.1.2 API ZYM

Soubor API ZYM obsahuje řadu biochemických testů, které nejsou podstatné pro výrobu vína a navíc vykazovaly u testovaných kmenů podobné výsledky, proto jsou v tabulce č. 5 prezentovány pouze výsledky vztahující se k důležitým enzymům.

Tab. č. 5 - Vyhodnocení enzymatických aktivit jednotlivých kmenů (API – ZYM; bioMérieux)

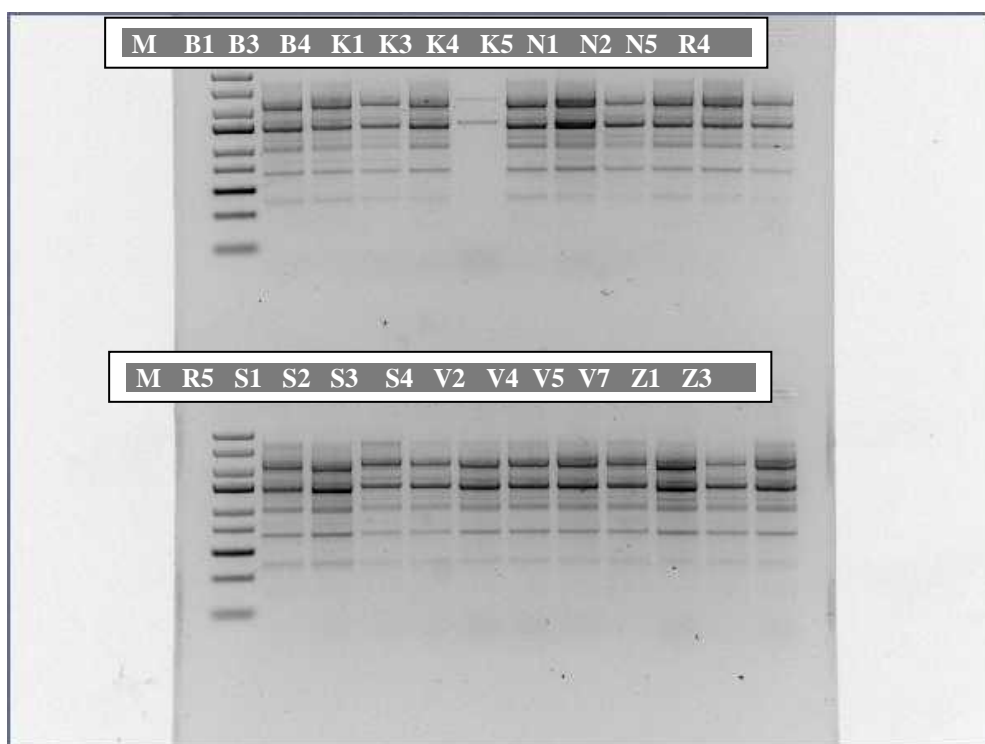
Označení kmene	Esterasa (C4)	α -glukosidasa
Bočky 1	slabá	velmi silná
Bočky 3	slabá	velmi silná
Bočky 4	silná	velmi silná
Kolberk 3	slabá	velmi silná
Kolberk 4	slabá	velmi silná
Kolberk 5	slabá	velmi silná
Novosádky 1	slabá	velmi silná
Novosádky 2	slabá	velmi silná
Novosádky 5	silná	velmi silná
Novosádky 6	slabá	velmi silná
Růžový 2	slabá	velmi silná
Růžový 3	slabá	velmi silná
Růžový 4	silná	velmi silná
Růžový 5	silná	velmi silná
St. Hory 1	velmi slabá	velmi silná
St. Hory 2	velmi slabá	velmi silná
St. Hory 3	velmi slabá	velmi silná
Veselý 2	slabá	velmi silná
Veselý 5	velmi slabá	velmi silná
Veselý 7	slabá	velmi silná
Zbavce 1	slabá	velmi silná
Zbavce 3	slabá	velmi silná
Zbavce 6	velmi slabá	velmi silná
Komerční kvasinka	slabá	velmi silná

Výsledkem tohoto testu je zjištění, že všechny vybrané kvasinky mají velmi silnou aktivitu enzymu α -glukosidasa. Testované kmeny Bočky 4, Novosádky 5, Růžový 4, Růžový 5 vykazovaly vysokou aktivitu enzymu esterasy (C4).

6.2 Vyhodnocení identifikace pomocí rep-PCR

Kmeny, u kterých byly zaznamenány alespoň malé biochemické odlišnosti, byly vybrány pro přesnější identifikaci touto metodou. Výsledky rep-PCR s použitím primeru (GTG)₅ po analýze na agarosovém gelu jsou zdokumentovány na elektroforeogramu na obrázku číslo 10. Vzhledem k tomu, že všechny testované kmeny vykazovaly stejný fingerprintový profil a metoda rep-PCR je vhodná pro odlišení mikroorganismů na druhovou úroveň, lze konstatovat, že se jednalo o shodný druh.

Obr. č. 10 - Elektroforeogram rep-PCR



Použité označení kmenů a velikostního markeru:

M – velikostní marker, B1 – Bočky 1, B3 - Bočky 3, B4 – Bočky 4, K1 – Kolberk 1, K3 – Kolberk 3, K4 – Kolberk 4, K5 – Kolberk 5, N1 – Novosádky 1, N2 – Novosádky 2, N5 – Novosádky 5, R4 – Růženy 4, R5 – Růženy 5, S1 – St. Hory 1, S2 – St. Hory 2, S3 – St. Hory 3, S4 – St. Hory 4, V2 – Veselý 2, V4 – Veselý 4, V5 – Veselý 5, V7 – Veselý 7, Z1 – Zbavce 1, Z3 – Zbavce 3

6.3 Vyhodnocení fermentačních schopností kvasinek

Pro prokvašení každého z 10 testovaných moštů bylo použito 7 kmenů kvasinek, které pocházely z různých lokalit VOC Modré hory a jeden kmen komerčních kvasinek. Mezi jednotlivými kmeny kvasinek byla zaznamenána minimální variabilita v prokvašení jednotlivých moštů. Kromě množství vyprodukovaného etanolu byl ve všech vzorcích pomocí plynové chromatografie změřen metanol, ten však v žádném vzorku nebyl detekován. Stupeň prokvašení moštu (množství produkovaného alkoholu) téměř nezávisel na použitém kmeni kvasinek, ale především na složení moštu. Proto jsou v tabulce č. 6 uvedeny průměrné hodnoty cukernatosti a průměrné hodnoty vyprodukovaného alkoholu stažené k jednotlivým moštům.

Tab. č. 6 - Výsledky fermentační schopnosti izolovaných kvasinek pro různé mošty

Název moštu	Počáteční cukernatost v g/l	Průměrná cukernatost 7. den fermentace v g/l ± směrodatná odchylka	Průměrný obsah alkoholu 7. den fermentace v obj. % ± směrodatná odchylka	Průměrná cukernatost 15. den fermentace v g/l ± směrodatná odchylka
Muškát - Mělník	188,00	51,30 ± 2,17	12,80 ± 0,40	50,00 ± 0,00
Semling - Mělník	185,00	50,00 ± 0,00	11,80 ± 0,23	50,00 ± 0,00
Tramín červený - Mělník	210,00	60,00 ± 4,33	12,80 ± 0,41	51,30 ± 3,33
Sv. Vavřinec - Mělník	180,00	47,00 ± 3,48	11,00 ± 0,30	44,00 ± 4,15
Dornfelder - Mělník	172,00	42,50 ± 3,53	10,40 ± 0,24	40,00 ± 2,50
Hibernal - Mělník	200,00	68,00 ± 8,99	11,90 ± 0,81	60,00 ± 5,59
Müller Thurgau - Mělník	181,00	43,00 ± 2,42	10,20 ± 0,31	42,50 ± 2,17
Modrý Portugal - Karlštejn	160,00	48,00 ± 5,00	9,50 ± 0,55	45,00 ± 3,31
Dornfelder - Karlštejn	185,00	67,50 ± 5,56	9,80 ± 0,65	51,00 ± 3,90
Směs odrůd - Mělník	145,00	41,30 ± 3,31	8,80 ± 0,85	40,00 ± 0,17

U všech sledovaných kmenů byla zaznamenána schopnost dostatečně prokvasit všechny mošty. Nejvyšší hodnota směrodatné odchylky v rámci fermentačních schopností se projevila u moštu odrůdy Hibernal (Mělník) a v produkci etanolu u moštu ze směsi odrůd (Müller Thurgau a Muškát – obojí z Mělníku). Naopak nejmenší rozptyl byl zaznamenán

z prokvašení moštů Semling a Dornfelder (také oba z Mělnických vinogradů). Průměrná hodnota zbytkového cukru ze všech „vín“ byla 7. den 52,40 g/l a 15. den 47,38 g/l. Množství alkoholu bylo proměnlivé v závislosti na počáteční cukernatosti moštu.

V tabulce č. 7 je uvedeno, jaké rozdíly ve fermentační schopnosti byly zaznamenány mezi použitými kmeny. Hodnota průměrné produkce alkoholu určitého kmenu je průměrem všech hodnot produkce etanolu v jednotlivých mošttech touto kulturou.

Tab č. 7 - Schopnost jednotlivých kmenů produkovat etanol

Označení kmene	Průměrná hodnota produkce etanolu ze všech moštů v obj. % ± směrodatná odchylka
Bočky 4	10,80 ± 1,46
Kolberk 3	10,90 ± 1,33
Novosádky 5	11,20 ± 1,11
Růžový 4	10,70 ± 1,89
Sv. Hora 1	10,80 ± 1,20
Veselý 2	10,90 ± 1,38
Zbavce 1	10,60 ± 1,22
Komerční kmen	11,10 ± 1,52

Z výsledků je zřejmé, že mezi jednotlivými kmeny nebyly zaznamenány větší rozdíly ve schopnosti produkovat etanol. Rozdíl mezi průměrnými hodnotami pro jednotlivé kmeny je pouze 0,60 obj. procent. Největší produkce etanolu prokázal kmen označený jako Novosádky 5 z viniční trati Novosádky. Naopak nejhůře fermentoval kmen Zbavce 1. Komerční kmen prokázal velmi dobrou fermentační schopnost a skončil celkově jako druhý nejlepší kmen v produkci etanolu.

Dále byly vyhodnoceny 2 nejproduktivnější a 2 nejméně produktivní kmeny ve vztahu k obsahu etanolu v jednotlivých moštích. Toto srovnání spolu s průměrným obsahem etanolu v 7. den fermentace je znázorněno v tabulce č. 8.

Tab. č. 8 - Porovnání 2 nejvýkonnějších a 2 nejméně výkonných kmenů v produkci etanolu v jednotlivých moštích

Název moštu	2 kmeny, které produkovaly nejvíce etanolu	Obsah etanolu v obj. %	2 kmeny, které produkovaly nejméně etanolu	Obsah etanolu v obj. %
Muškat - Mělník	Komerční kmen	13,70 %	St. Hory 1	12,50 %
	Novosádky 5	13,00 %	Růžový 4	12,20 %
Semling - Mělník	St. Hory 1	12,20 %	Veselý 2	11,70 %
	Novosádky 5	12,10 %	Bočky 4	11,40 %
Tramín červený - Mělník	Zbavce 1	13,20 %	Veselý 2	12,20 %
	Novosádky 5	13,10 %	St. Hory 1	12,00 %
Sv. Vavřinec - Mělník	Komerční kmen	11,30 %	St. Hory 1	10,70 %
	Bočky 4	11,20 %	Růžový 4	10,40 %
Dornfelder - Mělník	Bočky 4	10,90 %	Zbavce 1	10,20 %
	Novosádky 5	10,60 %	Kolberk 3	10,10 %
Hibernal - Mělník	Novosádky 5	12,80 %	Veselý 2	11,70 %
	Komerční kmen	12,70 %	Bočky 4	10,00 %
Müller Thurgau - Mělník	Novosádky 5	10,90 %	Růžový 4	9,90 %
	Bočky 4	10,40 %	Komerční kmen	9,90 %
Modrý Portugal - Karlštejn	Novosádky 5	10,10 %	Kolberk 3	9,3 %
	St. Hory 1	10,00 %	Zbavce 1	8,30 %
Dornfelder - Karlštejn	Veselý 2	11,00 %	St. Hory 1	9,30 %
	Novosádky 5	10,30 %	Růžový 4	8,70 %
Směs odrůd - Mělník	Bočky 4	9,40%	Novosádky 5	8,2 %
	Růžový 4	9,40 %	Zbavce 1	6,7 %

Z uvedené tabulky vyplývá, že rozdílné kmeny v rámci jednoho moštu dokázaly vyprodukovat velmi podobná množství etanolu. Největší rozdíl byl u moštu z mělnické směsi odrůd Müller Thurgau a Muškát. Rozdíl mezi kmeny, které fermentovaly tento mošt nejlépe (Bočky 4 a Růžený 4) a kulturou, která kvasila nejméně efektivně (Zbavce 1) byl 2,70 objemových procent.

7 Diskuze

Při výrobě vína, se dnes nejvíce používají aktivní sušené vlnařské kvasinky (ASVK kultury), tyto selektované kvasinky často pochází dokonce z jiného kontinentu než vyráběné víno. Dlouholeté zkušenosti ukázaly, že kvalita vína je značně ovlivněna použitým kmenem. Proto je v dnešních moderních vlnařských technologiích třeba hledat ideální kvasinkové kultury pro fermentaci určitých odrůd (Usbeck, 2014).

Jedním z nových trendů ve vlnařství je aplikace autochtonních kvasinek, jako iniciačních kultur. Vínu mohou dodat širší a zajímavější aromatické spektrum a také plnější chuť než při použití komerčních kmenů. Zároveň použití vybraných kultur zdůrazní typické sensorické rysy vyrobených vín pro konkrétní vlnařský region (Izquierdo, 2003).

Snaha selektovat vhodné autochtonní kvasinky je zřejmá již posledních 15 let. Vlnaři se snaží produkovat originální vína, která se budou lišit od konvenčně vyráběných vín. V České republice, jak již bylo uvedeno v literární rešerši, bylo první velké vlnařství, které začalo s využitím autochtonních kvasinek Znovín Znojmo a.s. Strategie některých vlnařství využívat autochtonní kvasinky se výrazně liší. Výše zmíněný Znovín Znojmo a.s. se orientuje na použití selektovaných autochtonních startovacích kultur z tamních vinogradů. Výběr vhodných kultur na základě biochemických a molekulárně genetických testů vede k lepší předvídatelnosti vyrobeného produktu. Naopak vlnařství, která patří do spolku „Autentisté“, nepoužívají startovací kultury a mošty kvasí díky přítomnosti autochtonních kvasinek přítomných na bobulích a sklepním zařízení.

Tato diplomová práce přispěla k poznatkům ohledně charakterizace, identifikace a fermentačních schopností izolovaných kvasinek z vlnařského regionu VOC Modré Hory. Zmíněný vlnařský region se rozkládá v mírně kopcovitém terénu nedaleko Věstonické nádrže a pálavských vrchů. Vlnařský region Modrých Hor tvoří katastry obcí Bořetice, Kobylí, Němčičky, Velké Pavlovice a Vrbice. V současnosti může vína označená jako VOC Modré Hory produkovat jen 16 vlnařů ze 130 ha vinic. Kvasinky, které byly testovány v této diplomové práci, byly izolovány z viničních tratí Bočky, Kolberk, Novosádky, Růžený, Staré Hory, Veselý a Zbavce.

Pro analýzu těchto kvasinek bylo vybráno 34 kmenů izolovaných ze 7 viničních tratí patřící pod vlnařskou obec Němčičky. Kultury byly izolovány z kvasů ve fázi bouřlivého kvašení za použití Malt Extract agaru (Oxoid). K identifikaci byly použity biochemické soupravy API 20 C AUX a API ID 32 C určené pro identifikaci bakterií a kvasinek. Pomocí

soupravy API 20 C AUX bylo 32 z 34 analyzovaných kmenů identifikováno jako *Saccharomyces cerevisiae*. Touto metodou byly 3 kmeny určeny jako nesacharomycetní kmeny. Každý z těchto 3 kmenů byl izolován z jiné viniční tratě. Kmen Kolberk 1 byl identifikován jako *Candida pelliculosa*, kmen St. Hora 2 byl identifikován jako *Candida utilis* a kmen Veselý 5 byl identifikován jako *Pichia angusta*. Soupravou API ID 32 C však byly tyto 3 kmeny určeny jako *Saccharomyces cerevisiae*. Také kmen označený jako St. Hora 1 byl pomocí soupravy API 20 C AUX identifikován jako *S. cerevisiae*, ale soupravou API ID 32 C identifikován jako *Candida colliculosa*. Z těchto výsledků je zřejmé, že identifikace těmito systémy není vždy jednotná. Můžeme však říci, že těmito soupravami bylo dosaženo velmi podobných výsledků. Identifikace se lišila jen ve 4 z 34 případů. Přesností uvedených identifikačních kitů se zabýval Deak et al (1993) a následně i Ramani et al. (1998). Deak et al. (1993) identifikoval 166 kvasinek izolovaných z koncentrovaných ovocných džusů. Procento izolátů správně identifikovaných bylo vyšší u soupravy API ID 32 C (86 %). Souprava API 20 C AUX byla přesná jen v 76 % případů. Nepřesnosti v identifikaci jsou podle Deak et al. (1993) způsobené nedostatečnou databází kvasinek v rámci vyhodnocovacího programu. Podle Verweij et al. (1999) databáze pro testovací kit API ID 32 C čítá 64 kvasinkových druhů a API 20 C AUX jen 43. I toto může být důvodem, proč ve zmíněných studiích dopadl identifikační kit API ID 32 C lépe než kit API 20 C AUX. Další srovnání těchto dvou souprav provedl Ramani et al. (1998) ve své studii. Porovnával spolehlivost identifikace obou souprav na 123 běžně se vyskytujících a 120 „neobvyklých“ kmenech kvasinek. Soupravou API 20 C AUX bylo správně identifikováno 97 % běžně se vyskytujících kmenů a 88 % „neobvyklých“ kmenů. Soupravou API ID 32 C bylo správně určených často se vyskytujících kmenů 92 % a „neobvyklých“ kmenů 85 %. Identifikační kit API 20 C AUX se hojněji užívá ve Spojených státech. Naopak kit API ID 32 C je více používán v Evropě. Ramani et al. (1998) konstatuje, že obě soupravy jsou velmi efektivní v identifikaci často se vyskytujících kultur, ale horší výsledky dosahují v identifikaci méně častých taxonů. Toto potvrdily i výsledky této diplomové práce, protože většina kvasinek byla identifikována shodně oběma testy jako *Saccharomyces cerevisiae*.

Pomocí analytické soupravy API ZYM pro zjištění enzymatických aktivit kvasinek byla prokázána velmi silná aktivita enzymu α -glukosidáza u všech testovaných kmenů. Tento enzym je potřebný ke štěpení disacharidů a polysacharidů obsahující glukosu. Testované kmeny Bočky 4, Novosádky 5, Růžový 4, Růžový 5 vykazovaly vysokou aktivitu enzymu esterasy (C4). Estery se řadí k nejdůležitějším aromatickým látkám ve smyslovém hodnocení vín. Ve víně vznikají reakcí organických kyselin a alkoholů během fermentace. Esterasy

katalyzují jejich tvorbu. Schopností produkovat estery se mnohé kvasinky liší. U těchto kmenů je tedy předpoklad, že výrazně obohatí aromatický profil vyráběných vín například produkcí etyl-butyrátu, který se ve vínech podílí na ovocné vůni jablek či ananasu.

Výhodou testů je nenáročnost na jejich provedení, rychlost a nízké požadavky na laboratorní vybavení. Nevýhody těchto testů mohou být jejich cena a případné nepřesnosti. Například Verweij et al. (1999) zabývající se srovnáním souprav API ID 32 C a API 20 C AUX uvádí, že měly v experimentální části problém se stanovením přesné turbidity připravené suspenze pro inokulaci. Další problémy mohou být způsobeny kontaminací analytu z prostředí a subjektivním vyhodnocením barevných změn v jamkách testu. Použité metody mohou být pouze prvním krokem k přesné a správné identifikaci.

Identifikace pomocí výše zmíněných souprav (API 20 C AUX, API ID 32 C) a charakterizace enzymatických aktivit testovaných kmenů (API ZYM) jsou vhodné metody k provedení poměrně přesné identifikace velkého počtu vzorků. Pro dosažení přesnější analýzy byly vybrány kmeny, u kterých byly zaznamenány odlišnosti na základě biochemických testů, dále podrobeny molekulárně genetické analytické metodě rep-PCR za použití primeru (GTG)₅.

Výstupem této molekulárně genetické metody je fakt, že všechny analyzované kmeny měly stejné fingerprintové profily. Dá se tedy konstatovat, že se jedná o stejný druh navzdory drobným odlišnostem, které byly prokázány biochemickými metodami. Boeckhout et al. (2003) uvádí, že primer (GTG)₅ se často využívá k vytvoření databáze pro rychlou identifikaci nově izolovaných vzorků a PCR fingerprinting je podle něj spolehlivá metoda, kterou lze kvasinky rozlišit na druhovou úroveň. Vhodnost této identifikační metody potvrzuje i studie, kterou provedl Hierro et al. (2004). V této studii srovnával vhodnost použití 3 různých PCR metod k identifikaci kvasinek (PCR-ISS, ERIC-PCR and rep-PCR). Měl k dispozici 41 referenčních kmenů patřících do 15 různých druhů a 40 autochtonních kmenů, izolovaných první den fermentace, z vinných kvasů. Tyto autochtonní kmeny se do kvasů dostaly z bobulí červené odrůdy Grenache. Porovnáním PCR fingerprintů neznámých izolátů s referenčními byly kmeny úspěšně identifikovány. Všechny 40 autochtonních kmenů bylo zařazeno do 15 druhů. Všechny tři PCR techniky byly vyhodnoceny jako rychlé, spolehlivé a jednoduché metody identifikace kvasinek. Nevýhodou těchto metod jsou vysoké nároky na přístrojové vybavení laboratoře a nutnost optimalizovat podmínky PCR reakcí pro potřeby konkrétního pracoviště.

Důvodem proč v této diplomové práci byly všechny kmeny určeny jako jediný kvasinkový druh, může být fakt, že kultury byly izolovány z kvasů ve fázi bouřlivého kvašení

a tak v kvasech převládaly už jen kultury druhu *Saccharomyces cerevisiae*, které potlačily nesacharomycetní rody. Fleet (2003) tuto úvahu potvrzuje tím, že jako hlavní faktor působící na populaci kvasinek během fermentace uvádí etanol, který je produkován ve vyšší míře kvasinkami druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Zvyšující se koncentrace etanolu během fermentace, způsobuje snížení druhové variability. Dále uvádí, že schopnost produkce etanolu kvasinek, které nepatří k výše zmíněnému druhu, je velmi omezená. Řádově etanol produkují do 4 až 5 objemových procent. Tato teorie je podpořena i výsledky fermentačního experimentu, neboť analyzované kvasinky během fermentace vyprodukovaly v průměru kolem 11 % etanolu. Takto vysoké produkce etanolu by nesacharomycetní kvasinky ve víně nebyly schopny. Dále Fleet (2003) uvádí, že existuje mnoho různých faktorů, které ovlivňují výskyt a růst kvasinek během fermentace. Jedná se například o rodové a druhové složení původní populace přítomné ve vinném moštu, inokulaci tohoto moštu selektovanými kulturami, chemické složení moštu, který může obsahovat zbytky pesticidů či fungicidů, teplotu během fermentace a interakce mezi různými taxony mikroorganismů.

Z fermentačního experimentu, ve kterém bylo v této diplomové práci použito 7 kmenů kvasinek izolovaných z různých lokalit VOC Modré hory a jeden komerční kmen vyplývá, že podstatné rozdíly ve fermentačních schopnostech mezi identifikovanými kmeny nebyly zpozorovány. Pro každý použitý kmen byla zaznamenána hodnota průměrné produkce alkoholu, která je průměrem všech hodnot produkce etanolu v jednotlivých moštích touto kulturou. Rozdíl mezi průměrnými hodnotami pro jednotlivé kmeny je pouze 0,60 obj. %. Variabilita v prokvašení všech 10 různých moštů byla velmi malá. Stupeň prokvašení moštu (množství alkoholu) tedy nezávisel na použitém kmeni kvasinky, ale na složení moštu.

Průměrný obsah alkoholu vyrobených „vín“ se pohyboval kolem 11 obj. %. Lze tedy konstatovat, že se jedná o slabá vína. Relativně nízký obsah alkoholu byl způsoben faktem, že vinné mošty nebyly doslazovány, a tím kvasinky fermentovaly mošty s různým obsahem cukrů. Pokud by byla vína doslazena, produkce alkoholu by byla pravděpodobně vyšší. Další možnost, jak je možné dosáhnout vyšší produkce etanolu ve víně, je podle Minárika (2005) použití směsných kultur, které se skládají ze dvou nebo více druhů či kmenů vhodných k výrobě kvalitních vín. Ty do jisté míry nahrazují aktivitu kvasinek spontánního kvašení. Vína fermentovaná přirozeně se vyskytujícími apikulátními kvasinkami nebo přidanými směsnými kulturami mají bohatší aromatický profil než vína fermentovaná pouze jednou čistou kulturou. Použití směsných kultur má další výhodu v tom, že zde není tak velké ekonomické riziko ve srovnání s použitím neselektovaných apikulátních kvasinek. Při aplikaci vybraných směsných kultur je také větší předvídatelnost výsledného produktu.

Minárik (2005) také uvádí, že mošt prokvasí tak dobře, že vznikají polosuchá až suchá vína. Polosuchá vína mají nejvýše 4 g zbytkového cukru na litr a suchá dokonce do 4 g zbytkového cukru na litr. Tyto hodnoty zbytkového cukru jsou o mnoho nižší než „vína“ vyrobená v experimentální části této práce. Průměrná hodnota zbytkového cukru ze všech „vín“ byla 7. den 52,40 g/l a 15. den 47,38 g/l. Lze tedy konstatovat, že vyrobená vína by se řadila podle obsahu zbytkového cukru spíše do sladkých vín (45 g a více). Tento fakt může být způsoben fermentačními schopnostmi izolovaných autochtonních kvasinek prokvášet mošt méně nebo zastavením fermentace v důsledku zvyšující se teploty v průběhu kvasného procesu. Teplota nad 30 °C může zpomalit či zastavit fermentaci (Robinson, 2006).

Minárik (1986) zmiňuje, že nejvíce zbytkového cukru byl zaznamenán u zákvasů, kde byly použity druhy *Candida pulcherrima*, *Kloeckera apiculata*. Nejhlubšího prokvašení bylo naopak dosaženo u vín fermentovaných směsnými kulturami: 1) *Turolopsis rosei*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, 2) *Turolopsis rosei*, *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces carlsbergensis* a 3) *Turolopsis rosei*, *Saccharomyces vini*, *Saccharomyces oviformis*. Tato vína měla dobré organoleptické vlastnosti, především příjemnou vůni a chuť. Vína zaočkovaná čistou kulturou byla také chuťově přijatelná s vyrovnanou chutí, hladina alkoholu byla však nižší podobně jako u spontánně kvašeného vína. Směsné kultury kvasinek, které jsou připraveny z oddělených zákvasů, se během fermentace vinného moštu rychleji pomnoží na začátku kvašení (*Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces vini*). V kvasech zakvašených směsnou kulturou ze společného zákvasu mívá převahu *Saccharomyces oviformis*. V průběhu kvašení moštu, kde byla použita čistá kultura při dostatečném zákvasu (2 %) dominuje především použitý druh kvasinek.

Využitím různých rodů kvasinek se zabývá řada odborníků po celém světě už řadu let. Často se vinaři orientují na autochtonní kmeny, neboť to dodává vínu typičnost a originalitu pro určitou oblast. Například v Kampánii, v jižní Itálii, se tradičně víno vyrábí přirozenou (spontánní) fermentací autochtonními kulturami sacharomycetních i nesacharomycetních kvasinek. Sorrentino et al. (2012) analyzovali, jaké z autochtonních kvasinek či jejich kombinace jsou vhodné k produkci místního vína s lepšími organoleptickými vlastnostmi. Vybraly hrozny jedné z nejstarších odrůd nazvané Aglianico. Izolované kvasinky byly identifikovány morfologickými, biochemickými a molekulárními metodami a byly zařazeny do rodů *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Hanseniaspora* a *Rhodotorula*. V rámci těchto rodů byly charakterizovány laboratorními testy dva původní druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *Metschnikowia fructicula*. Vybrané kmeny z těchto z výše

zmíněných 2 druhů byly použity jako startovací fermentační kultury. Pokusy prokázaly některé pozitivní rozdíly ve srovnání s komerčními kmeny. Kultury mají velmi dobrou prokvašovací schopnost a mají pozitivní vliv na kvalitu vína. Autochtonní kvasinky zvýšily celkovou kyselost a obsah alkoholu, aniž by produkovaly velké množství kyseliny octové. HPLC analýza ukázala významné zvýšení koncentrace kyseliny gallové, katechinů a resveratrolu. Výsledky prokázaly, že oba kmeny úspěšně dominovaly během fermentace a přispěly ke zlepšení organoleptických vlastností vína. Tato testování mohou podle Sorrentino et al. (2012) vést ke znovunalezení typických regionálních vín.

Další studie, která se zabývá autochtonními kvasinkami, je z Makedonie. V této studii analyzoval Ilieva et al. (2013) 80 autochtonních kvasinkových kmenů. Byly izolovány z odrůd Vranec a Cabernet Sauvignon, pěstovaných ve vinařské oblasti Tikveš v republice Makedonie. Po identifikaci kvasinek bylo vybráno 10 kmenů (*Saccharomyces cerevisiae*), které byly použity k výrobě vín Vranec a Cabernet Sauvignon. Byl testován jejich vliv na kvalitu vína. Za tímto účelem byly sledovány tyto parametry: obsah alkoholu, celkových kyselin, těkavých kyselin, redukujících cukrů a pH. Kromě toho byla provedena analýza celkového obsahu antokyanů a polyfenolů, intenzita barvy a odstínu (použitím spektrofotometrické metody). Výsledky ukázaly, že nejvyšší obsah polyfenolů a antokyanů byly naměřeny ve víně fermentovaném kmenem označeným F-20 v odrůdě Cabernet Sauvignon a kmenem F-8 v odrůdě Vranec. Celkově nejlepší jakostní víno bylo získáno s těmito dvěma kvasinkami.

Trendem i v portugalském vinařském průmyslu začíná být testování a následné využití regionálních kmenů kvasinek. Tyto praktiky zvýrazňují terroir tamní vinařské oblasti. Jako poslední ze tří výzkumů autochtonních kvasinek ve světě je zde uvedena studie Cabral Almeida et al. (2014). Tato studie byla financována Evropskou unií. Cílem tohoto výzkumu bylo najít vhodné autochtonní kvasinky ze 4 hlavních vinařských oblastech v Portugalsku, které by mohly být využity v Sogrape Vinhos SA (velké portugalské vinařství). V této práci bylo izolováno 768 autochtonních kmenů z 6 vinogradů patřící společnosti Sogrape Vinhos SA ve čtyřech různých vinařských oblastech v Portugalsku (Douro, Dao, Bairrada a Alentejo). Nejprve byly kmeny identifikovány a následně byl sledován jejich enologický potenciál jako startovacích kultur. Každý kmen byl identifikován – pomocí molekulárně-biologického fingerprintingu. Z izolovaných 768 kmenů bylo vybráno 33 kmenů (z toho 4 nesacharomycetní) k dalším testům. Vybrané kmeny byly podrobeny laboratorním mikrofermentačním testům ve sterilních mošttech. Na výrobu moštů byly použity bílé i rosé odrůdy. K dalšímu testování bylo z uvedených 33 kmenů vybráno 5 (1 nesacharomycetní).

Tyto byly použity k výrobě bílých vín. Následně byly provedeny 4 senzorická hodnocení během 5 měsíců. Všechny laboratorní i fermentační pokusy byly kontrolovány molekulárními metodami ke kontrole přítomnosti daných kmenů. Kmeny se dále testují a mají velký potenciál pro portugalskou vinařskou produkci v uvedených oblastech.

Selekce vhodných autochtonních kmenů je podle mého názoru tou správnou cestou, kudy se mají především menší regionální vinaři ubírat. Existuje mnoho (již zmíněných) efektivních metod pro identifikaci a následnou selekci kultur a tato diplomová práce přináší jen zlomek poznatků, které metody jsou vhodné k identifikaci autochtonních kvasinek a charakterizaci jejich fermentačních schopností. Při dalším studiu by bylo vhodné zaměřit se na sledování více parametrů v rámci fermentace. Především na těkavé aromatické látky, celkový obsah kyselin a obsahy jednotlivých organických kyselin.

8 Závěr

V této diplomové práci se podařilo izolovat 34 autochtonních kmenů kvasinek z vinařského regionu VOC Modré Hory. Vybrané kmeny byly dále charakterizovány biochemickými a molekulárně-biologickými metodami. Byl proveden fermentační experiment pro zjištění fermentačních schopností vybraných druhů.

- Biochemickými soupravami byly téměř všechny kmeny identifikovány jako *Saccharomyces cerevisiae*. Všechny analyzované kmeny měly téměř stejné fermentační profily a vykazovaly také velmi podobnou enzymatickou aktivitu.
- Příslušnost ke stejnému druhu potvrdila rep-PCR.
- Použité metody pro identifikaci a charakterizaci kvasinek jsou vhodné pro druhové zařazení.
- V rámci fermentačního experimentu nebyly mezi kmeny shledány žádné podstatné rozdíly ve schopnosti mošt prokvasit.
- Produkce alkoholu nezávisela na konkrétním kmeni kvasinek, ale na složení moštu.

9 Seznam použité literatury

Ado, S. A., Kachalla, C. U., Tijjani, M. B., Aliyu, M. S. 2009. Ethanol production from corn cobs by co-cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*, Bayero J. Pure Applied Sciences, č. 2, 99-101.

Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A. 2011. Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. Food Microbiology. 28 (8). 1483-1491.

Bábíková, P. 2010. Vinařská mikrobiologie. 1. vydání. Brno: Mendelova univerzita. ISBN 978-80-7375-465-5.

Barba, A., Oliva, J., Payá, P. 2010. Influence of Fungicide Residues in Wine Quality, Fungicides, Odile Carisse.

Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T., 2010. Pivovarství-Teorie a praxe výroby piva. VŠCHT Praha. 904 s.

Bendová, O., Kahler, M. 1981. Pivovarské kvasinky. SNTL. Praha. 118 s.

Black, J., Wiley, J. 1999. Microbiology- Principles and Explorations. New York. p. 786.

Boeckhout, T., Robert, V. 2003. Yeast in food. Cambridge England: Woodhead publishing

Cabral Almeida, B., Centeno, F., Teixeira, M. F., Tenreiro, R., McGuire, D., Pessanha, M., Prior, P. 2014. Sogrape Vinhos S. A., Aldeia Nova, Novel selection of portuguese autochthonous yeast strains isolates; behaviour study in fermentations. Avintes, Portugal. 4430-809.

Capece, A., Fiore, C., Maraz, A., Romano, P. 2005. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *Appl Environ Microbiol.* 9. 136-144.

Darriet, P., Tominga, T., Lavigne, V., Boidron, J., Dubourdiou, D. 1995. Identification of a powerful aromatic compound of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragrance J.* 10. 385 - 392.

Dubourdiou, D., Tominaga, T., Masneuf, I., Peyrot Des Gachons, C., Murat, M. L. 2006. The role of yeast in grape flavour development during fermentation: the example of Sauvignon Blanc. *Viticulture and Enology* 57. 81 - 88.

Ďurčanská, K., Furdíková, K., Malík, F., Ševcech, J., Hronská, H. 2010. Autochónne kultúry kvasiniek v praxi. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. ISBN 978-80-552-0387-4.

Farkaš, J. 1983. *Biotechnológia vína*. Bratislava, 220 – 277.

Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology.* 86. 11-22.

Fleet, G. H., Heard, G. M. 1993. *Yeasts: growth uring fermentation. Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers. Chur. Switzerland. 27-54.

Furdíková, K., Malík, F., Ďurčanská, K. 2007. Kvasinky vo vinárstve. *Vinařský obzor* 10. 486 – 489. ISSN 1212 – 7884.

Furdíková, K., Malík, F., Ďurčanská, K., Ševcech, J., Hronská, H. 2010. *Saccharomyces cerevisiae - z laboratória do praxe.: Vinič a víno.* 10 (2). 56-58. ISSN 1335-7514.

Giardina B. J., Stanley B. A., Chiang H. L. 2012. Comparative Proteomic Analysis of Transition of *Saccharomyces cerevisiae* from Glucose-Deficient Medium to Glucose-Rich Medium. *Proteome Sci.* p. 40.

Guillamón, J. M., Sabate', J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169. 387–392.

Hauser, N. C., Fellenberg, K., Gil, R., Bastuck, S., Hoheisel, J. D., Pérez-Ortín, J. E. 2001. Whole genome analysis of a wine yeast strain. *Comp. Funct. Genom.* 2: 69–79.

Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews.* 52 (4). 536–553.

Hierro, N., González, A., Mas, A., Guillamón, J. M. 2004. New PCR-based methods for yeast identification. Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Unitat d'Enologia, Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments (CeRTA), Universitat Rovira i Virgili. Ramó'n y Cajal, Tarragona, Spain.

Ilieva, F., Violeta, I., Dimovska, V., Mitrev, S., Karov, I., Spasov, H. 2013. Influence of autochthonous yeasts on the quality of wines from Vranec and Cabernet Sauvignon varieties. 24th International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry, Sarajevo, Izmir.

Izquierdo, P. M., Garcia, E., Palacios, A. T., Chacon, J. L., Martinez, J. 2003. Enological suitability of yeast strain indigenous to Castilla-La Mancha for red wine production. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.* 7-9.

Janderová, B., Bendová O. 1999. Úvod do biologie kvasinek. Praha: Nakladatelství Karolinum.

Kamzolova, S. V., Shishkanova, N. V., Morgunov, I. G., Finogenova, T. V. 2003. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research.* 3. 217-222.

Kapitola „Autentisté“ [online]. [cit. 2015-3-17]. Dostuné z <<http://autentiste.eu/charta-autentistu/>>.

- Kocková-Kratochvílová, A. 1982. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Alfa. Bratislava.
- Kocková-Kratochvílová, A. 1990. Yeasts and yeast-like Organisms. Verlagsgesellschaft mbH Weinheim. 546.
- Kopecká, J., Matoulková, D., Němec, M. 2012. Kvasinky a jejich využití. Kvasný průmysl. 58 (11-12). 326-335.
- Kurtzman, C., Piskur, J. 2006. The yeast handbook-Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. Springer-Verlag. New York. 29–46. ISBN 0-8493-1926-9.
- Mills, D. A., Johannsen, E. A., Cocolin, L. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. Appl Environ Microbiol. 68. 4884-4893.
- Minárik, E. 1986. Vplyv čistej kultúry a zmesi čistých kultúr kvasiniek na kvasenie hroznového muštu. Kvasný průmysl, č. 4.
- Minárik, E. 2005. Aktivné suché vinné kvasinky verus spontánna fermentácia. Vinařský obzor 1.
- Moreira, N. F., Mendes, P., Guedes de Pinho, T., Hogg, I., Vasconcelos, I. 2008. Heavy Sulphur Compounds, Higher Alcohols and Esters Production Profile of *Hanseniaspora Uvarum* and *Hanseniaspora Guilliermondii* Grown as Pure and Mixed Cultures in Grape Must. International Journal of Food Microbiology. 124. 231-38.
- Murat, M. L., Tominaga, T., Dubourdieu, D. 2001. Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. J. Agric. Food Chem. 49. 5412 - 5417.
- Niimura, Y., Ling, P., Calf, P. 1989. Aerobic and anaerobic metabolism in a facultative anaerobe Ep01 lacking cytochrome, quinone and catalase. FEMS Microbiology Letters. 61 (2). 79-83.

- Pérez, F., Nevado, H., Albergaria, T., Hogg, F. 2006. Girdle death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*. 108. 3. 336–345.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein D. A. 1996. *Microbiology*-third edition, Wm. C. Brown Publishers. New York. ISBN: 0-697-29390-4.
- Pretorius, I. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16. 675-729.
- Pronk, J. T., Steensma H. Y., Dijkem van J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 12. 1607-1633.
- Ramani, R., Gromadzki, S., Pincus, D. H., Salkin, I. F., Chaturvedi, V. J. 1998. Efficacy of API 20C and ID 32C Systems for Identification of Common and Rare Clinical Yeast Isolates. *Clin Microbiol*. 36 (11). 3396–3398.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. 2000. *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinification*. England.
- Robinson, J. 2006. *The Oxford Companion to Wine-Third Edition* . Oxford University Press. 693-695. ISBN 0-19-860990-6.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. 2003. Function of Yeast Species and Strains in Wine Flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 86. 169-80.
- Rychtera, M., Uher, J., Páca, J. 1987. *Lihovarství, droždářství a vinařství. skriptum VŠCHT. Praha*.
- Sierkstra, L. N., Nouwen, N. P., Verbakel, J. M. A. and Verrips, C. T. 1993. Regulation of glycolytic enzymes and the crabtree effect in galactose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 9.787–795.

Sorrentinoa, A., Boscainoa, F., Cozzolino, R., Volpea, M., Ionatab, E., La Car, F. 2012. Autochthonous Fermentation Starters for the Production of Aglianico Wines. Istituto di Scienze dell'Alimentazione, Avellino, Italia.

Steidl, R., Renner, W. 2004. Problémy kvašení vín. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, ISBN 80-903201-3-9.

Swiegers, J. H., Capone, D. L., Elsey, G. M., Sefton, M. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., Pretorius, I. S. 2007. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*. 24. 561 - 574.

Swiegers, J. H., Willmott, R., Hill-Ling, A., Capone, D. L., Pardon, K. H., Elsey, G. M., Howell, K. S., de Barros Lopes, M. A., Sefton, M. A., Lilly, M., Pretorius, I. S. 2006. Modulation of volatile thiol and ester aromas in wine by modified wine yeast. In *Developments in Food Science*. 43.

Šilhánková, L. 2002. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology (3. vydání). Akademie věd ČR. Praha. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

Švejcar, V. 2004. Kvasinky, teplota a kvašení, *Vinařský obzor* 1/ b. ISSN: 1212- 7884.

Toriya, M. J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamón J. M., Mas, A. 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*. 85 (1-2). 127-136.

Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Grieco, F., Tufariello, M., Quarta, A., Mita, G., Spano, G., Grieco, F. 2011. Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 10.

Usbeck, J. C., Wilde, C., Bertrand, D., Behr, J., Vogel, R. F. 2014. Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(8). 3737-52.

Verweij, P. E., Breuker, I. M., Rijs, A. J., Meis, J. F. 1999. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. Department of Medical Microbiology, University Hospital Nijmegen, The Netherlands.

VOC Modré Hory [online]. [cit. 2015-3-2]. Dostupné z <<http://www.vocmodrehory.cz/>>.

Vodrážka, Z. 2006. Biochemie. Akademie věd ČR, Praha. 191 s.

Výroba vína [online]. [cit. 2015-3-10]. Dostupné z <<http://www.vinohruska.cz/vyroba-vina.html>>.

Zandycke, S. M., Quain, D., Smart, K. A. 2000. Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact in brewing fermentations. *Microbiology*. 146. 1023–1034.