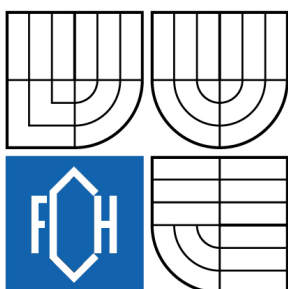




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# IDENTIFIKACE VINNÝCH KVASINEK METODOU PCR-RFLP

IDENTIFICATION OF WINE YEASTS BY PCR-RFLP METHOD

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

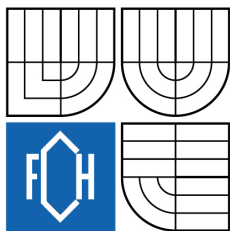
Bc. HANA ŠURANSKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0259/2008** Akademický rok: **2008/2009**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bc. Hana Šuranská**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**  
Konzultanti diplomové práce:

### Název diplomové práce:

Identifikace vinných kvasinek metodou PCR-RFLP

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Realizace metody PCR-RFLP na řešený problém
3. Zpracování výsledků a jejich zhodnocení

### Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

-----  
Bc. Hana Šuranská  
Student(ka)

-----  
Mgr. Dana Vránová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

-----  
doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá identifikací vinných kvasinek metodou PCR-RFLP.

Identifikace a charakteristika kvasinek prodělala v posledních letech výrazné změny. Byly zavedeny nové metody taxonomického zařazování založené na molekulárních metodách, které směřují ke snadné a rychlé identifikaci. Jednou z těchto metod je metoda PCR-RFLP. Amplifikací oblasti 5·8S-ITS rDNA polymerázovou řetězovou reakcí za použití primerů ITS1 a ITS4 dojde k amplifikaci specifického úseku DNA. Takto namnožená DNA je po přečištění ethanolem a vysušení podrobena restrikční analýze. Použitím restrikčních endonukleáz dojde k naštípání DNA na specifické úseky charakteristické pro daný druh. Naštípané fragmenty lze oddělit v elektrickém poli v agarózovém gelu a následně vyhodnotit.

V práci bylo použito 63 typových kvasinek, které byly analyzovány použitím sedmi restrikčních endonukleáz – *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII*, *Taq<sup>α</sup>I*, *AluI* a *MseI*. Výsledný obraz štěpení typových kvasinek byl srovnán s výsledkem štěpení identifikovaných vinných kvasinek a tyto kvasinky byly následně taxonomicky zařazeny. Posouzení genetické podobnosti bylo provedeno pomocí programu BioNumerics a výsledkem jsou dendrogramy, k jejichž vytvoření byly využity Jaccardovy koeficienty.

## ABSTRACT

This thesis deals with identification of the wine yeasts by applying the PCR-RFLP method.

The identification and characteristic of the yeasts has gone through substantial changes in recent years. There have been introduced new methods of taxonomic classifying based on the molecular methods, which are oriented to easy and fast identification. One of these methods is the PCR-RFLP method. The amplification of the 5·8S-ITS rDNA sequence by the polymerase chain reaction with use of the primers ITS1 and ITS4 leads to the amplification of the specific sequence of DNA. Such multiplied DNA is after repurifying by the ethanol and drying submitted to the restriction analysis. With use of the restriction endonuklases DNA is chopped into the specific segments typical for the particular genus. The chopped fragments can be separated in the electric field in the agarose gel and subsequently evaluated.

In this thesis together 63 type yeasts were used. These yeasts were analysed by applying of the seven restriction endonuklases – *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII*, *Taq<sup>α</sup>I*, *AluI* a *MseI*. The final image of type yeasts splitting was compared to the results of splitting of already identified wine yeasts and these yeasts were subsequently taxonomically classified. Evaluation of genetic similarity was conducted by program BioNumerics and as the results the dendrograms that were created with use of Jaccard's coefficients are obtained.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, identifikace, PCR-RFLP, genetická podobnost, dendrogramy.

## KEY WORDS

Yeasts, identification, PCR-RFLP, genetic similarity, dendrograms.



ŠURANSKÁ, H. *Identifikace vinných kvasinek metodou PCR-RFLP*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 100 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....  
podpis studenta

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Vránové, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení při realizaci této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci Ing. Renatě Vadkertiové, Ph.D. a pracovníkům z Chemického ústavu SAV Bratislava.



# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Kvasinky .....</b>	<b>13</b>
2.1.1	Morfologie .....	14
2.1.2	Cytologie.....	14
2.1.3	Růst a rozmnožování.....	15
2.1.3.1	Vegetativní rozmnožování.....	15
2.1.3.2	Pohlavní rozmnožování .....	15
2.1.4	Metabolismus kvasinek se zaměřením na alkoholové kvašení vína.....	16
2.1.5	Víno a jeho aromatický profil .....	18
2.1.6	Vinné kvasinky a jejich příspěvek ke kvasnému procesu .....	19
2.1.7	Nejvýznamnější kvasinky účastníci se kvasného procesu.....	20
2.1.7.1	Rod <i>Hanseniaspora</i> .....	20
2.1.7.2	Rod <i>Rhodotorula</i> .....	20
2.1.7.3	Rod <i>Pichia</i> .....	20
2.1.7.4	Rod <i>Candida</i> .....	21
2.1.7.5	Rod <i>Issatchenkia</i> .....	21
2.1.7.6	Rod <i>Kluyveromyces</i> .....	21
2.1.7.7	Rod <i>Metschnikowia</i> .....	22
2.1.7.8	Rod <i>Schizosaccharomyces</i> .....	22
2.1.7.9	Rod <i>Zygosaccharomyces</i> .....	22
2.1.7.10	Rod <i>Saccharomycodes</i> .....	22
2.1.7.11	Rod <i>Saccharomyces</i> .....	23
<b>2.2</b>	<b>Metody identifikace kvasinek .....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Izolace a purifikace nukleových kyselin .....	27
2.2.1.1	Fenolová extrakce.....	27
2.2.1.2	Izolace a purifikace za použití komerčních setů .....	27
<b>2.3</b>	<b>PCR-RFLP jako metoda taxonomického zařazení kvasinek .....</b>	<b>28</b>
2.3.1	Polymerázová řetězová reakce .....	28
2.3.1.1	Princip a průběh PCR .....	28
2.3.1.2	Komponenty potřebné pro PCR směs.....	29
2.3.2	Polymorfismus délky restričních fragmentů u PCR produktů.....	30
2.3.3	Detekce nukleových kyselin.....	32
<b>2.4</b>	<b>Jiné možnosti identifikace kvasinek založené na molekulárně biologických metodách .....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Použité mikroorganismy, chemikálie, přístroje a pomůcky .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Mikroorganismy .....	34
3.1.2	Chemikálie .....	34

3.1.3	Přístroje a pomůcky.....	34
<b>3.2</b>	<b>Kultivační média a roztoky .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Příprava kultivačního média.....	35
3.2.2	Příprava 10×TBE pufru.....	35
3.2.3	Příprava 1×TBE pufru.....	36
3.2.4	Příprava 1×TBE pufru s ethidium bromidem.....	36
3.2.5	Příprava EtBr.....	36
3.2.6	Příprava délkových standardů 100 bp a 20 bp.....	36
3.2.7	Příprava 2% agarózového gelu.....	37
3.2.8	Příprava 3 M octanového pufru.....	37
3.2.9	Příprava 80% ethanolu.....	37
3.2.10	Příprava PCR směsi.....	37
<b>3.3</b>	<b>Pracovní postupy.....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Izolace DNA.....	38
3.3.2	PCR.....	38
3.3.3	Elektroforetická detekce PCR produktu.....	39
3.3.4	Přečištění PCR produktu.....	39
3.3.5	Restrikční analýza.....	40
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Příprava typových kvasinek.....</b>	<b>41</b>
4.1.1	Kultivace kvasinek.....	41
4.1.2	Izolace DNA.....	41
4.1.3	Amplifikace DNA pomocí PCR.....	41
4.1.4	Restrikční analýza (PCR-RFLP).....	44
4.1.4.1	Enzym <i>Hae</i> III.....	44
4.1.4.2	Enzym <i>Hha</i> I.....	46
4.1.4.3	Enzym <i>Taq</i> <sup>α</sup> I.....	48
4.1.4.4	Enzym <i>Hin</i> fl.....	50
4.1.4.5	Enzym <i>Hpa</i> II.....	51
4.1.4.6	Enzym <i>Alu</i> I.....	53
4.1.4.7	Enzym <i>Mse</i> I.....	55
4.1.5	Shrnutí výsledků štěpení všech enzymů pro jednotlivé rody.....	57
4.1.5.1	Kvasinky rodu <i>Rhodotorula</i> .....	57
4.1.5.2	Kvasinky rodu <i>Pichia</i> .....	57
4.1.5.3	Kvasinky rodu <i>Hanseniaspora</i> .....	57
4.1.5.4	Kvasinky rodu <i>Saccharomyces</i> .....	58
4.1.5.5	Další vinné kvasinky.....	58
4.1.6	Dendrogramy typových kvasinek rodu <i>Saccharomyces</i> a <i>Hanseniaspora</i> .....	59
4.1.6.1	Dendrogram rodu <i>Saccharomyces</i> .....	59
4.1.6.2	Dendrogram rodu <i>Hanseniaspora</i> .....	60
<b>4.2</b>	<b>Identifikace kvasinek izolovaných z vína.....</b>	<b>61</b>
4.2.1	Kultivace kvasinek.....	61



4.2.2	Izolace DNA.....	61
4.2.3	Amplifikace DNA vzorků pomocí PCR.....	61
4.2.4	Restrikční analýza vzorků kvasinek (PCR-RFLP).....	63
4.2.4.1	Enzym <i>Hae</i> III.....	63
4.2.4.2	Enzym <i>Hha</i> I.....	64
4.2.4.3	Enzym <i>Taq</i> <sup>α</sup> I.....	65
4.2.4.4	Enzym <i>Hinf</i> I.....	67
4.2.4.5	Enzym <i>Hpa</i> II.....	68
4.2.4.6	Enzym <i>Alu</i> I.....	69
4.2.4.7	Enzym <i>Mse</i> I.....	70
4.2.5	Dendrogramy kvasinek izolovaných z vína.....	72
4.2.5.1	Dendrogram rodu <i>Saccharomyces</i> .....	72
4.2.5.2	Dendrogram rodu <i>Hanseniaspora</i> .....	73
<b>4.3</b>	<b>Taxonomické zařazení identifikovaných kvasinek.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4</b>	<b>Jiná možnost odlišení kvasinek rodu <i>Saccharomyces</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>88</b>

# 1 ÚVOD

Kvasinky představují jednou z nejdůležitějších skupin mikroorganismů. Jejich široké využití je známo v celé řadě oblastí věd, medicíny a technologií. Některé druhy jsou využívány jako biologické modelové systémy pro studium obecných regulací metabolismu eukaryotických buněk, jiné, díky jejich schopnosti zkvašovat cukry na ethanol a oxid uhličitý, jsou po staletí využívány zejména k produkci fermentovaných potravin a alkoholických nápojů. Jedním z těchto produktů je víno. Při jeho přípravě hrají hlavní roli kvasinky rodu *Saccharomyces*. Procesu spontánního kvašení se však neúčastní pouze tento rod kvasinek, ale i mnoho jiných druhů, jako je např. rod *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula* aj. Vinné kvasinky pozitivně přispívají k chuti a vůni vína tvorbou vyšších alkoholů a esterů, čímž silně ovlivňují sensorické vlastnosti výsledného produktu a tvoří tzv. buket vína [1, 2, 3].

Identifikace, správné pojmenování a zařazení kvasinek je významné v mnohých oblastech vědy, ať už se jedná o zemědělství, medicínu, biologické vědy, potravinářský průmysl nebo biotechnologii. Schopnost rozlišení mezi divokými a ušlechtilými kvasinkami je přínosné v kvasném průmyslu, při produkci alkoholických nápojů. Během fermentace mohou totiž divoké kvasinky způsobit nežádoucí chuť a vůni výsledného produktu. Kažení potravin způsobené těmito mikroorganismy může vést k obrovským ekonomickým ztrátám při produkci, zpracování a skladování produktů určených k lidské spotřebě. Proto je třeba v průmyslu aplikovat rychlé, jednoduché a spolehlivé metody detekce mikroorganismů způsobujících znehodnocení potravin a zajistit tak rychlou identifikaci možné kontaminace [2, 4, 5].

Kvasinky jsou často klasifikovány na základě morfologických, fyziologických a biochemických vlastností. Tato tradiční metodologie zahrnuje cca 60 – 90 testů, proces je složitý a časově náročný. Navíc v některých případech mohou testy poskytnout nejisté a chybné výsledky. V poslední době byl výzkum zaměřen na zlepšení a zjednodušení metod identifikace průmyslově využívaných mikroorganismů [6].

Došlo k rozvoji nových molekulárních technik založených na podobnosti a odlišnosti DNA, RNA nebo proteinů. Jedná se zejména o DNA-DNA hybridizaci, PCR, nested-PCR a jiné modifikace polymerázové řetězové reakce, RAPD, RFLP chromosomální a mitochondriální DNA, sekvenování aj. [6].

Metoda PCR–RFLP byla popsána jako hodnotný nástroj identifikace určitých druhů kvasinek s potenciálním praktickým využitím při monitoringu mikrobiálního zastoupení v průběhu kvasných procesů. Rychlé informace o složení kvasinkové mikroflóry, přítomné během produkce vína, mohou pomoci kontrolovat fermentační proces a zajistit tak dobrou kvalitu vína [7, 8].

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kvasinky

Kvasinky řadíme mezi jednobuněčné heterotrofní organismy. Tyto eukaryotní mikroorganismy, náležící mezi houby (*Fungi*), se rozmnožují zejména vegetativně – pučením nebo dělením, některé se množí i pohlavně a to tvorbou tzv. vřecek. Hojně se vyskytují v přírodním prostředí, často na cukerných substrátech, které mají tendenci zkvašovat [4].

Kvasinky lze pokládat za jednu z nejdůležitějších skupin mikroorganismů. Díky jejich schopnosti zkvašovat cukry jsou po staletí průmyslově využívanými mikroorganismy při výrobě fermentovaných potravin a alkoholických nápojů. V poslední době, vzhledem k rozvoji kvasného průmyslu, nacházíme jejich stále větší uplatnění v biotechnologiích, kde jsou používány zejména k produkci sekundárních metabolitů (antibiotika, vitaminy a enzymy). Působení kvasinek však nemá pouze pozitivní stránku. Nepříznivě ovlivňují kvalitu potravin a nápojů tím, že je kazí a rozkládají [6, 9].

Velká většina kvasinek se řadí mezi tzv. bílé kvasinky neboť tvoří na kultivačních půdách bílé zbarvené kolonie. Nevyskytují se však pouze bílé zbarvené kolonie, ale i červené (růžové) a černé. Červeně zbarvené kolonie tvoří kvasinky rodu *Rhodotorula*, mezi tmavě až černě zbarvené kolonie kvasinek řadíme rod *Aureobasidium*. Zajímavostí tohoto rodu je, že kolonie jsou zpočátku bílé a až postupem času černají [10].

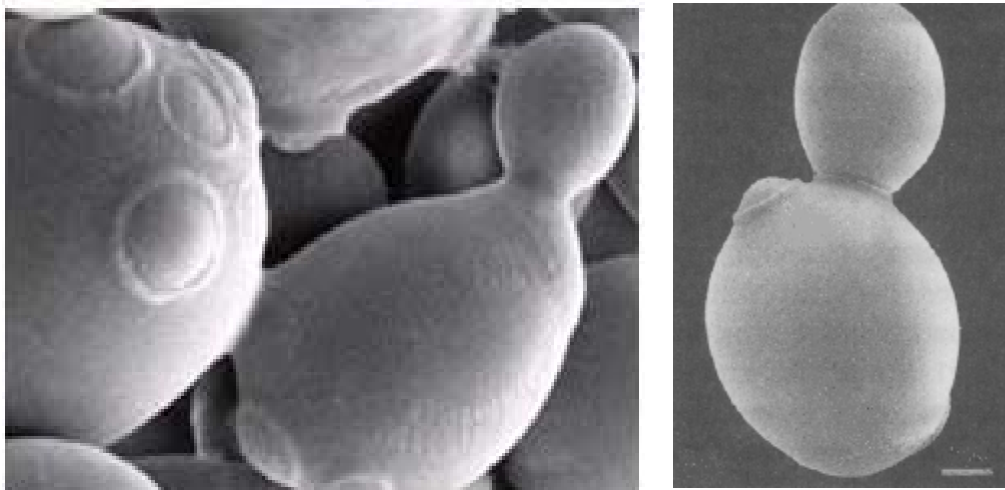
**Taxonomické zařazení kvasinek:** [11]

Nadříše: *Eucaryota*

Říše: *Fungi*

Oddělení: *Eumycota*

Třída: *Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes*



**Obr. 1:** Mikroskopický obraz (ESM) kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [12]

### 2.1.1 Morfologie

Buňky kvasinek vykazují velkou rozmanitost ve vztahu k velikosti buněk, jejich tvaru a barvě. I přes vývoj nových molekulárně biologických metod je morfologie stále využívána při klasifikaci a taxonomickém zařazování těchto mikroorganismů. Sleduje se zejména typ pučení, dělení, velikost a tvar buňky, který úzce souvisí s vegetativním rozmnožováním a je do značné míry ovlivněn stářím buňky a kultivačními podmínkami [3].

Základním tvarem je rotační elipsoid a od něj se odvozují tvary další – oválný, charakteristický zejména pro kvasinky rodu *Saccharomyces* (zobrazeny na obr. 1), kulovitý, typický pro *Rhodotoruly*, citronovitý tvar mají například buňky rodu *Kloeckera*, válcovité jsou *Schizosaccharomycety*. Nemusí se však vyskytovat pouze tyto sférické tvary, ale existují i podlouhlé až vláknité formy. Tvary buněk jsou zobrazeny na obrázku 2. Velikost buněk, která je dána rodovou příslušností a podmínkami kultivace, se pohybuje v rozmezí od 3 – 15  $\mu\text{m}$  [2, 3, 13, 14].



**Obr. 2:** Tvary buněk kvasinek

*a – kulatý; b – oválný neboli elipsoidní; c – citronovitý; d – ogivální; e – lahvovitý; f – podlouhlý, g – vláknitý* [15]

### 2.1.2 Cytologie

Cytologie, jiným slovem buněčná biologie, je věda zabývající se buněčnou strukturou a morfologií strukturních složek buňky. Obecně, buněčná charakteristika kvasinek zahrnuje makromolekulární složky (proteiny, glykoproteiny, polysacharidy, lipidy, nukleové kyseliny) a morfologickou odlišnost. Kvasinková buňka po mnoho let fascinovala cytology zejména díky tomu, že se jedná o jednobuněčný organismus vykazující ultrastrukturální znaky vyšších eukaryotických buněk. Buněčné organely a makromolekulární struktury hrají klíčovou roli v biotechnologii [4].

Kvasinkovou buňku tvoří následující struktury: buněčná stěna, periplasma, plazmatická membrána, cytosol, jádro, mitochondrie, Golgiho aparát, vakuoly, peroxisomy [12].

Na povrchu buněk se nachází tzv. buněčné obaly, které chrání buňku, ohraničují její vnitřní strukturu a hrají důležitou roli při výměně látek a udržování osmotické rovnováhy. Jedná se o plazmatickou membránu, periplasmatický prostor a buněčnou stěnu. Buněčná stěna chrání buňku před mechanickými vlivy a osmotickým šokem. Hlavní složkou stěny jsou polysacharidy tvořící hustou spleť vyplněnou bílkoviny, malým množstvím lipidů a fosfolipidů. Pod buněčnou stěnou se nachází tenká vrstva, složená z lipidů a proteinů, nazývaná cytoplazmatická membrána. Zde jsou umístěny transportní mechanismy zodpovědné za přenos látek do buňky a z ní. Membrána je volně propustná pouze pro malé molekuly bez náboje. Vnitřní prostor buněk je vyplněn průhlednou, homogenní hmotou nazývanou cytoplazma. V cytoplazmě potom můžeme nalézt systém dvojité membrány

neboli endoplazmatické retikulum, ribozómy sloužící k syntéze bílkovin, dále mitochondrie sídlo dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace, vakuoly, Golgiho aparát, cytoskelet neboli síť proteinových vláken umožňujících pohyb organel uvnitř buňky a jádro, které hraje důležitou roli při rozmnožování [4, 13].

### 2.1.3 Růst a rozmnožování

Činnost kvasinek, funkce a struktura buňky i jejich rozmnožování závisí na mnoha faktorech, ať už jde o množství a dostupnost substrátů nezbytných pro syntézu složek buňky a zisk energie, tak i na fyzikálních, chemických a biologických podmínkách. Jedná se zejména o teplotu, pH,  $a_w$ , oxido-redukční potenciál, povrchové napětí, vliv záření, výskyt přechodných kovů v prostředí nebo množství ethanolu [3].

#### 2.1.3.1 Vegetativní rozmnožování

Vegetativně neboli asexuálně se kvasinky reprodukuje pučením, dělením nebo tvorbou konidií na krátkých stélkách nazývaných sterigmata. Tvorba pupenu je výchozí při identifikaci jednotlivých druhů kvasinek pomocí morfologických metod [2].

Důležitým předpokladem reprodukce je zajištění správného zdvojení genetického materiálu a dostupnost substrátů, neboli látek potřebných k syntéze buněčné hmoty. Dosáhnou-li buňky kritické velikosti a jsou-li stimulovány exogenními nebo endogenními signály během interfáze, je zahájeno mitotické dělení. Celý buněčný cyklus je kontrolován a regulován více než stovkou genů, které jsou většinou označovány jako CDC geny [12, 13].

Nejběžnějším způsobem vegetativního rozmnožování je pučení. Pučení je zahájeno dosažením kritické velikosti mateřské buňky a počátkem syntézy DNA. Za zmínku stojí dva typy pučení – akropetální neboli bipolární, typické pro apikulární kvasinky a multilaterální, vyskytující se u kvasinek rodu *Saccharomyces*. Rozdíl mezi jednotlivými typy souvisí s tvorbou pupenu. Při multilaterálním pučení oddělením dceřiné buňky zůstává na mateřské buňce jizva a v místě této jizvy se již další pupen netvoří, kdežto při bipolárním pučení se v místě jizvy může vytvořit nový pupen [2, 4, 14].

Dalším typem vegetativního rozmnožování je příčné dělení, které lze charakterizovat jako zdvojení buňky, přičemž z jedné buňky vznikají dvě stejně velké buňky – mateřská a dceřinná, které se následně, po vytvoření dělicího septa, od sebe oddělí. Tento způsob rozmnožování je charakteristický pro rod *Schizosaccharomyces* [2, 14].

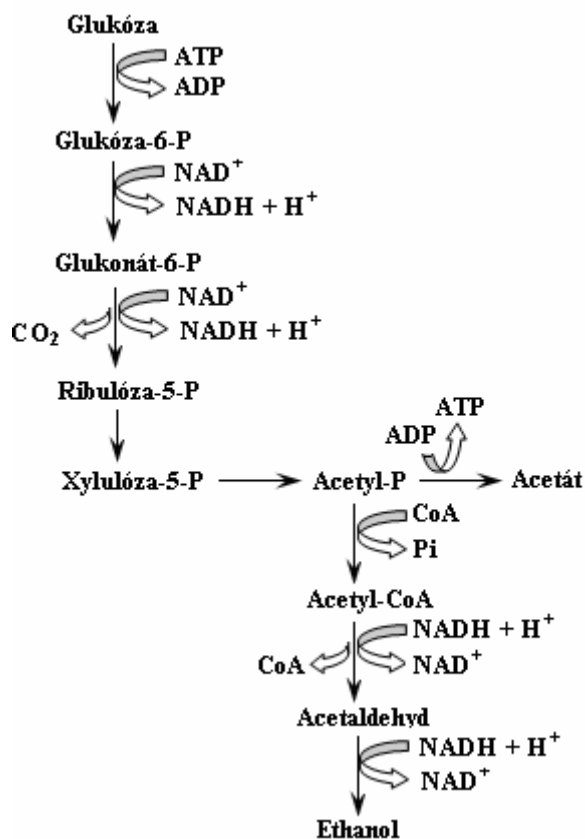
#### 2.1.3.2 Pohlavní rozmnožování

Vedle vegetativní reprodukce se u většiny kvasinek vyskytuje i pohlavní rozmnožování. Během pohlavního rozmnožování dochází ke konjugaci dvou haploidních buněk a ke spájení jader za vzniku diploidního jádra, které se následně meioticky dělí za vzniku čtyř haploidních jader. Takto dělená jádra jsou základem pohlavních spor – askospor, umístěných v asku neboli vřecku. Haploidní a diploidní fáze se v životním cyklu kvasinek střídají [13].

## 2.1.4 Metabolismus kvasinek se zaměřením na alkoholové kvašení vína

Pod pojmem *metabolismus* rozumíme biochemické procesy asimilace a disimilace živin buňkou – anabolismus a katabolismus. Anabolické procesy jsou redukční procesy vedoucí k produkci nového buněčného materiálu, kdežto katabolické procesy mají oxidační charakter. Během těchto procesů dochází k rozkladu látek složitých na látky jednodušší a k uvolnění energie [12].

Průmyslově nejvyužívanější metabolickou drahou kvasinek je alkoholové kvašení. Východím substrátem při fermentaci jsou sacharidy, které jsou glykolyticky (tzv. Embden-Meyerhofova dráha) přeměněny na pyruvát. Během procesu dochází k přenosu elektronů na  $\text{NAD}^+$  za vzniku redukované formy  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Pyruvát je následně za účasti enzymu pyruvátdekarboxylázy dekarboxylován na acetaldehyd, který je katalytickým působením enzymu alkoholdehydrogenázy redukován na ethanol. Dochází k přenosu elektronů z  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . V procesu je  $\text{NADH}$  zpětně reoxidován na  $\text{NAD}^+$ . Produkce ethanolu je znázorněna na obrázku 3 [4, 12, 16].

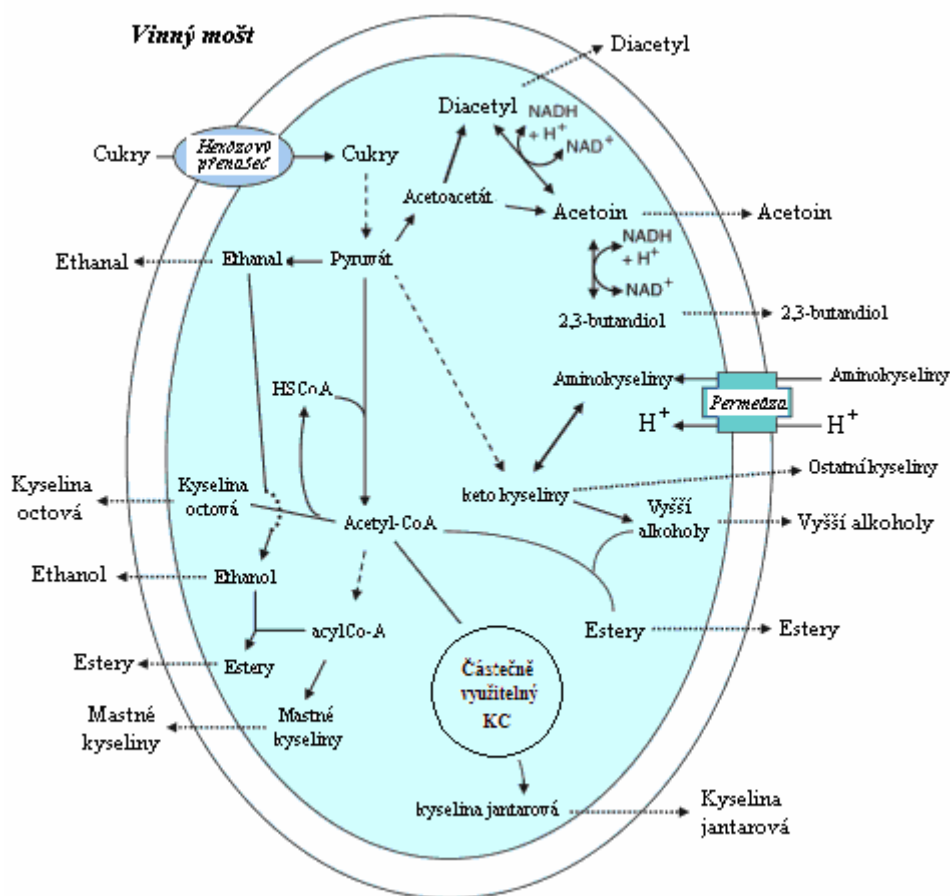


**Obr. 3:** Schématické znázornění produkce ethanolu a  $\text{CO}_2$  [17]

Alkoholové kvašení neboli fermentace je dynamický a komplexní proces, ve kterém hrají hlavní roli kvasinky a to především díky své biologické aktivitě. Fermentaci lze charakterizovat několika mechanismy. Jedná se o využití základních složek vinného moštu, tvorbu ethanolu a jiných rozpouštědel napomáhajících extrakci aromatických látek z pevného podílu hroznů, produkci enzymů, které transformují neutrální složky z vína na senzory aktivní sloučeniny, tvorbu stovek senzory aktivních sloučenin a sekundárních metabolitů a nakonec autolýzou buněk. Z produkovaných sekundárních metabolitů, které přispívají

ke komplexnosti vína, se jedná o kyseliny, alkoholy, estery, polyoly, aldehydy, ketony a další sloučeniny. Vyšší alkoholy a estery, tvořené během fermentace, pozitivně přispívají a ve výsledku silně ovlivňují sensorické vlastnosti vína. Nejvýznamnějšími finálními produkty metabolismu kvasinek jsou ethanol a oxid uhličitý [18].

Samotný proces fermentace můžeme popsat pomocí tří fází – *lag*, *exponenciální* a *stacionární* fáze. Během lag fáze musí kvasinky adaptovat svůj metabolismus na poměrně vysoký počáteční obsah glukózy/fruktózy (obvykle v poměru 1:1; 75 – 150 g·l<sup>-1</sup>), na nízké pH (2,9 – 3,8) a vysoký obsah SO<sub>2</sub> (40 – 100 mg·ml<sup>-1</sup>). Adaptace je důležitá pro růst mikroorganismů a přeměnu sacharidů na ethanol. Dalšími substráty obsaženými v moštu jsou kyselina vinná (2 – 10 g·l<sup>-1</sup>), kyselina jablečná (1 – 8 g·l<sup>-1</sup>), volné aminokyseliny (0,2 – 2,5 g·l<sup>-1</sup>) a malé množství pentóz, amonných iontů, vitaminů, pektinů a proteinů. Utilizace těchto složek vede k růstu mikroflóry a k tvorbě konečných produktů. V druhé neboli exponenciální fázi, jak už název napovídá, dochází exponenciálně k nárůstu biomasy, k tvorbě jedné třetiny ethanolu a malého množství glycerolu. Stacionární fáze je charakteristická tvorbou aromatických sloučenin, které ovlivňují kvalitu a sensoriku finálního produktu. V této fázi rovněž vzniká ethanol. Schématické znázornění produkce ethanolu a dalších vedlejších produktů vznikajících během fermentace je znázorněno na obr. 4. Fermentace končí ve chvíli, kdy koncentrace zbytkového cukru je 2 – 4 g·l<sup>-1</sup>. Proces obvykle trvá 7 – 10 dnů při výrobě červených vín a 15 – 20 dnů u bílých vín [1, 19, 20, 21].



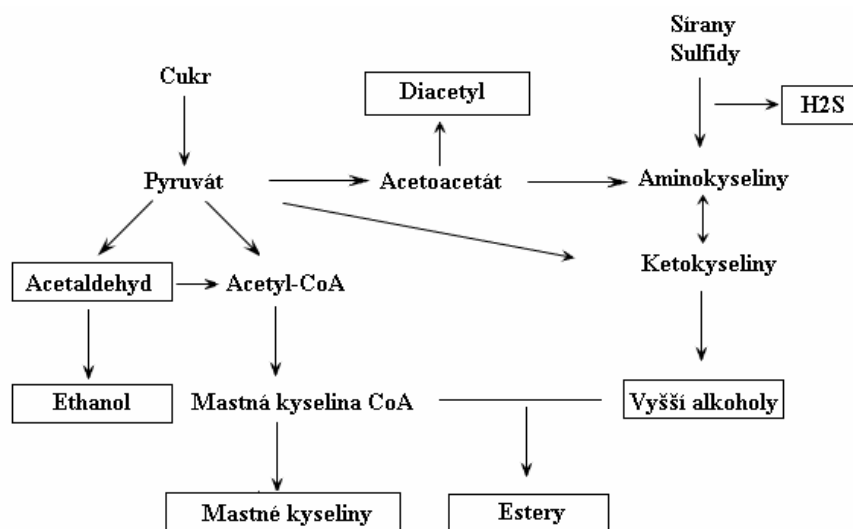
**Obr. 4:** Schématické znázornění syntézy ethanolu a jiných vedlejších produktů tvořených během metabolismu kvasinek. KC – Krebsův cyklus [18]

### 2.1.5 Víno a jeho aromatický profil

Víno je alkoholický nápoj získávaný z vinného moštu. Jeho příprava je známa více než 8000 let a je pokládána za nejstarší biotechnologický proces. Z fyzikálně-chemického hlediska lze víno charakterizovat jako neideální vícesložkový roztok obsahující vodu, ethanol, glycerol a organické kyseliny. Kromě těchto výše jmenovaných majoritních produktů vznikají během fermentace ještě tzv. sekundární metabolity. Jedná se především o aromatické a chuťové látky a sloučeniny fenolu. Tyto látky tvoří senzoryckou stránku vína a značně ovlivňují kvalitu finálního produktu. Metabolismus produkce těchto látek je znázorněn na obr. 5. K jejich produkci přispívají především kvasinky nezařazující se do rodu *Saccharomyces*, které se objevují v prvních stádiích spontánního kvašení. Sloučeniny tvořené těmito mikroorganismy můžeme rozdělit do tří skupin. Jedná se o majoritní těkavé produkty fermentace, látky tvořící buket vína a negativní neboli nežádoucí aromatické sloučeniny. Sloučeniny ovlivňující chuť a vůni vznikají nepřímo z majoritních produktů v metabolismu dusíkatých sloučenin. Jejich množství je velmi malé, ale ne zanedbatelné. Ve větším množství jsou tvořeny organické kyseliny, vyšší alkoholy a estery, v menší míře vznikají aldehydy. Mnohé studie ukazují, že kvalita vína je spojena s přítomností esterů. Estery jsou těkavé sloučeniny s pozitivním a žádoucím aspektem na buket vína. Vznikají buď reakcí vyšších alkoholů s acetyl-CoA za katalytického působení alkoholacetyltransferázy a dalších enzymů nebo reakcí sloučenin acetyl-CoA s ethanolem. Jedná se například o izoamyl-acetát, hexyl-acetát, ethyl-kaproát atd. Vyšší alkoholy vznikají v metabolismu aminokyselin a cukrů. Katabolismus aminokyselin vede ke vzniku ketokyselin. Aromatické látky mohou taktéž vznikat působením kvasinek na nearomatické prekurzory obsažené v moštu. Další sloučeninou, která nepřispívá k aromatickým vlastnostem, ale pozitivně působí na kvalitu vína tím, že zvyšuje senzoryckou stránku a fyzikálně-chemickou stabilitu produktu jsou tzv. mannoproteiny [1, 2, 17, 19].

Během fermentace nemusí vznikat pouze látky pozitivně ovlivňující kvalitu vína, ale může taktéž docházet k tvorbě nežádoucích sloučenin nepříznivě ovlivňujících chuť a vůni. Mezi negativní aromatické látky, které jsou schopny kvasinky produkovat, jsou řazeny sirné sloučeniny – sulfan, sulfidy, thioly (např. merkaptan), thioestery. Jako příklad můžeme uvést kvasinku *S. cerevisiae*, která je schopna z vinného moštu asimilovat mnoho sloučenin síry (např. aminokyseliny, sírany, glutathion, thiamin, biotin) a produkovat z nich látky nové, opět sirné povahy. Sirné sloučeniny negativně působí na aromatický profil vína nepříjemným zápachem po zkažených vejcích. Jednou z produkováných velmi nežádoucích sirných sloučenin je sulfan, který vzniká mikrobiální redukcí  $\text{SO}_2$ , síry nebo cysteinu. Další sloučeninou, která negativně ovlivňuje kvalitu vína je kyselina octová. Nežádoucí je jen pokud se vyskytuje v množství větším než  $700 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vyšší množství acetátu produkují divoké kvasinky *Kloeckera* ssp. a *Hansenula* ssp. Sloučeniny fenolu jsou často nežádoucí a jsou nositeli nepříjemného zápachu [2, 17, 22].





Obr. 5: Schématické znázornění metabolismu látek tvořících chuť a vůni vína [17]

### 2.1.6 Vinné kvasinky a jejich příspěvek ke kvasnému procesu

Jako mikroorganismy účastníci se kvasného procesu mohou být použity buď komerční kmeny nebo se využívá mikroflóra, která je přítomna na bobulích. Pokud se aplikují komerční kmeny kvasinek, jedná se o řízenou fermentaci, jestliže kvašení probíhá za účasti přirozené mikroflóry, mluvíme o fermentaci přirozené neboli spontánní. Na bobulích se vyskytují nejen kvasinky, ale i vláknité houby, bakterie mléčného kvašení, octové bakterie, často i bakteriofágy a viry. Interakcí těchto společenstev se vytváří synergický efekt a dochází k produkci aromatických sloučenin popsanych v předchozí kapitole. Všechny tyto mikroorganismy tedy značně přispívají a ovlivňují kvalitu vína. Počet a rozmanitost kvasinek, vyskytujících se na povrchu bobulí hroznu, je ovlivněna různými faktory. Jedná se zejména o odrůdu, stupeň zralosti, klimatické a geografické podmínky. Koncentrace buněk v čerstvém moštu se pohybuje v rozmezí  $10^4 - 10^5$  buněk·ml<sup>-1</sup> [17, 21, 22, 23].

Procesu spontánního kvašení se účastní různé druhy kvasinek. V počátcích kvašení, pro svoji nízkou fermentační aktivitu, se do procesu zapojují kvasinky rodu *Hanseniaspora* ssp., *Candida* ssp. a *Metschnikowia* ssp., *Rhodotorula* ssp. Druhově se jedná zejména o kvasinky *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata*, *Candida colliculosa*, *Metschnikowia pulcherrima*. Mohou se taktéž vyskytovat kvasinky rodu *Pichia* a *Kluyveromyces*. Tyto kvasinky vymírají po 2 – 4 dnech od započetí fermentace (některé prameny uvádí 3 – 5 dnů). Zanikání je způsobeno neschopností tolerance ke vzrůstající koncentraci produkovaného ethanolu, který je ve velkém množství produkován kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Vinařské kmeny *Saccharomyces* jsou zvláště významné a to především již zmiňovanou vysokou produkcí ethanolu. Díky své toleranci k ethanolu se uplatňují v pozdních stádiích fermentace [7, 21, 24].

Finální produkt přirozeného neboli spontánního kvašení lze tedy definovat jako výsledek kombinace působení různých druhů kvasinek a vlastností dané odrůdy vinné révy. Oba faktory přispívají určitým způsobem ke vzniku již zmiňovaných aromatických látek ovlivňujících organoleptické vlastnosti a senzoryckou kvalitu vína. Kvasinky tedy díky své

schopnosti využít sacharidy a produkovat ethanol hrají klíčovou roli při produkci vína [20].

### 2.1.7 Nejvýznamnější kvasinky účastníci se kvasného procesu

Mezi nejčastěji se vyskytující mikroorganismy, účastníci se fermentace, zahrnujeme kvasinky rodu *Saccharomyces* ssp., *Hanseniaspora* ssp., *Pichia* ssp., *Rhodotorula* ssp., *Schizosaccharomyces* ssp., *Kloeckera* ssp., *Kluyveromyces* ssp., *Metschnikowia* ssp., *Candida* ssp., *Cryptococcus* ssp. [23].

#### 2.1.7.1 Rod *Hanseniaspora*

Jedny z kvasinek, vyskytující se především na bobulích hroznů, jsou kvasinky rodu *Hanseniaspora* (anamorfa *Kloeckera*). Tvar buněk bývá kulovitý, vejcovitý nebo citronovitý. Rozmnožují se nepohlavně i pohlavně. Nepohlavně se reprodukuje bipolárním pučením, při pohlavním rozmnožování dochází k tvorbě askospor. Nejznámějším druhem je *Hanseniaspora uvarum*. Kvasinka fermentuje jen glukózu, asimiluje glukózu, celobiózu, 2-keto-D-glukonát a salicin [26, 27].

Kvasinky rodu *Hanseniaspora* převládají v počátečním stádiu fermentace a jejich působení je spojeno se změnami senzoričtých vlastností vína. Během několika prvních dnů fermentace se vyskytují ve vysoké koncentraci, která se udává v rozmezí  $10^6 - 10^7$  buněk·ml<sup>-1</sup>. Dokonce v některých případech může tato populace přetrvat po celou dobu fermentace v koncentraci vyšší než kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Růst těchto apikulárních kvasinek přispívá produkcí esterů, glycerolu a acetoinu ke komplexnosti finálního produktu. Během počáteční fáze fermentace produkuje ethyl-acetát. Nicméně růst nemá pouze pozitivní dopad na fermentaci, ale může ji i negativně ovlivnit tvorbou vyššího množství kyseliny octové a nežádoucích esterů. Navíc kvasinky *H. uvarum* mohou podávat zprávu k produkci tzv. killerova toxinu, který může ovlivnit kvasinky *S. cerevisiae*. Růstem těchto kvasinek v brzkém stádiu fermentace dochází ke spotřebě živin (např. thiaminu) potřebných pro růst kvasinek *S. cerevisiae*. Následkem toho dochází ke zpomalené a vleklé fermentaci [28, 29].

#### 2.1.7.2 Rod *Rhodotorula*

Ubikvitární kvasinky rodu *Rhodotorula* se řadí mezi tzv. červené kvasinkovité mikroorganismy. Jsou významné především tvorbou karotenoidů, což jsou pigmenty nerozpustné ve vodě a rozpustné v tucích. Buňky jsou malé, mohou být i protažené. V kapalném prostředí vytváří sediment. Lehce se kultivují, často se množí i na půdách bez dusíku. Produkují lipázu, ureázu a mají schopnost hromadit v buňkách tuk. Nepohlavně se rozmnožují pučením. Ve vínu se může vyskytovat *R. glutinis*, *R. minuta*, *R. graminis*. *R. glutinis* má schopnost zkvašovat maltózu, laktózu, sacharózu. Kromě těchto sacharidů asimiluje rafinózu, xylózu, arabinózu [30, 31].

#### 2.1.7.3 Rod *Pichia*

Z velkého množství různých druhů rodu *Pichia* můžeme jmenovat především dva druhy, které se vyskytují ve víně – *Pichia anomala* a *Pichia membranifaciens*. Z dalších druhů

je to např. *P. fermentans*, *P. guilliermondii*. Buňky jsou vejcovitého, cylindrického nebo elipsoidního tvaru a mohou vytvářet i bohatě větvené pseudomycelium a pravé hyfy. Rozmnožují se vegetativně multilaterálním pučením. Během pohlavního rozmnožování se tvoří askus, který obsahuje 1 – 4 spory kloboukovitého tvaru. Kolonie na tuhých médiích jsou bílé nebo krémové [26].

Buňky mají schopnost využít široké spektrum sacharidů a asimilovat dusík. *P. anomala* fermentuje glukózu, sacharózu a asimiluje glukózu, sacharózu, maltózu, celobiózu, trehalózu, rafinózu, rozpustný škrob, ethanol, glycerol, erythritol, D-mannitol a jiné látky. *P. membranifaciens* slabě fermentuje glukózu a asimiluje daleko menší počet sloučenin než *P. anomala*. Navíc *P. anomala* je schopna produkovat 0,2 – 4,5 obj. % alkoholu společně s malým množstvím kyseliny octové, ethyl-acetátu a izoamyl-acetátu [26].

*Pichia membranifaciens* se vyskytuje v počátcích kvašení, kdy na povrchu moštu vytváří bělošedou až šedou kožku, v níž jsou uzavřeny vzduchové bubliny. Buňky jsou schopny rozkládat alkohol na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Ve větším množství působí negativně na profil vína a to nepříjemnou chutí a vůní [32].

#### **2.1.7.4 Rod *Candida***

Rod *Candida* představuje velmi rozšířenou skupinu vzhledem k počtu kvasinek nalezených ve víně. Tvar buněk může být kulovitý, elipsoidní, cylindrický nebo protáhlý. Kvasinky se dělí multilaterálním pučením a dokáží fermentovat řadu sacharidů. Kvašení je však slabší než u rodu *Saccharomyces*. V závislosti na druhu mohou asimilovat dusičnany. Jedním druhem, který má tuto vlastnost je *Candida utilis*. Buňky mají schopnost zkvašovat maltózu, sacharózu, laktózu. Tvary jsou pravidelné, krátce cylindrické. *Candida stellata*, další druh vinné kvasinky, fermentuje a zároveň asimiluje glukózu, sacharózu a rafinózu. Některé druhy fermentují jen glukózu a asimilují velké množství sloučenin. Jedná se nejen o látky sacharidické povahy (např. glukóza, galaktóza, sacharóza, maltóza, D-xylóza, L-sorbóza, celobióza), ale mohou asimilovat i ethanol, glycerol, D-manitol, D-glucitol aj. Jedním z těchto druhů je *Candida pulcherrima* [26].

#### **2.1.7.5 Rod *Issatchenkia***

Druhy v rámci tohoto rodu se rozmnožují multilaterálním pučením. Při pohlavním rozmnožování tvoří 1 – 4 askospory. Ve víně můžeme nalézt především jeden druh, *I. orientalis* (anamorfa *Candida krusei*). Buňky tohoto druhu jsou vejcovité. Druh se řadí mezi tzv. kožkotvorné kvasinky. Užívá glukózu a ethanol a má schopnost asimilovat glukózu, ethanol, glycerol, laktát, sukcinát [31, 26].

#### **2.1.7.6 Rod *Kluyveromyces***

Rod *Kluyveromyces* patří do skupiny jednobuněčných, sedimentujících a také zkvašujících kvasinek. Původně se zařazoval do rodu *Saccharomyces*, ale byla nalezena řada rozdílů v jejich vlastnostech. Na rozdíl od rodu *Saccharomyces* mají kvasinky rodu *Kluyveromyces* schopnost oxidačně využít větší množství sacharidů, nepřekváší cukry tak hluboce, vytváří jen 4 – 4,5 % ethanolu (*S. cerevisiae* tvoří asi 8 – 15 % ethanolu), produkují ethyl-acetát a často obsahují hnědočervené barvivo. Buňky mohou být nejen elipsoidní

a oválné, ale vyskytují se i protáhlé tvary. Nepohlavně se rozmnožují pučením, během pohlavního rozmnožování je tvořen askus, ve kterém jsou dvě a více spor. Významným druhem vyskytujícím se ve víně je *Kluyveromyces lactis*. Kulovité, elipsoidní nebo cylindrické buňky se rozmnožují pučením nebo tvoří 1–4 kulovité, hladké askospory. Na povrchu kapalin vytváří tenkou blánu [2, 30].

#### **2.1.7.7 Rod *Metschnikowia***

Jedním z druhů, který můžeme nalézt na bobulích a ve víně je *Metschnikowia pulcherrima*. Kvasinka fermentuje glukózu a asimiluje nesčetné množství sloučenin od běžných sacharidů (glukóza, sacharóza, maltóza, celobióza aj.) přes ethanol, glycerol, D-manitol, D-glucitol, D-glukonát až po různé sloučeniny dusíku, jako je např. kadaverin, L-lysine, ethylamin. Buňky jsou schopny tolerovat  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  cykloheximidu (fungicid), ale množství  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  je už inhibičního charakteru. Některé druhy produkují hnědo-červený pigment, tzv. pulcherimin [26].

#### **2.1.7.8 Rod *Schizosaccharomyces***

Další skupinou kvasinek, vyskytující se ve víně, je rod *Schizosaccharomyces*. Buňky jsou cylindrické, vejcovité, často však bývají kulovité. Nepohlavně se rozmnožují dělením. Mohou tvořit mycelium a askus s 2–8 kulovitými nebo elipsoidními askosporami. Základním druhem, který můžeme nalézt v moštu nebo víně, je *Schizosaccharomyces pombe*. Buňky mají schopnost zkvašovat a asimilovat glukózu, sacharózu a maltózu. Navíc ještě asimilují rafinózu a D-glukonát. Druh nemá schopnost využít ethanol jako zdroj uhlíku a dusičnany jako zdroj dusíku [26].

#### **2.1.7.9 Rod *Zygosaccharomyces***

Nejčastější druhy rodu *Zygosaccharomyces* izolované z vinného moštu nebo vína jsou *Z. bisporous*, *Z. rouxii*, *Z. florentinus*. Tvarově kulovité, elipsoidní nebo protáhlé buňky se nepohlavně reprodukuje multilaterálním pučením. Při pohlavním rozmnožování je tvořeno 1–5 kulovitých nebo elipsoidních askospor uložených v asku. Schopnost fermentovat různé cukry je závislá na druhu, např. *Z. rouxii* fermentuje glukózu, maltózu a asimiluje kromě glukózy ještě glycerol, D-mannitol a D-glucitol. Nedokáže asimilovat dusičnany. Na rozdíl od mnoha jiných kvasinek mohou kvasinky rodu *Zygosaccharomyces* růst ve vysoce viskózním prostředí a jsou rezistentní vůči použití konzervačních látek a k  $\text{SO}_2$ . Významná je také extrémní tolerance k alkoholu. Kvasinky mohou růst ve víně s obsahem alkoholu 18 obj.% [26].

#### **2.1.7.10 Rod *Saccharomyces***

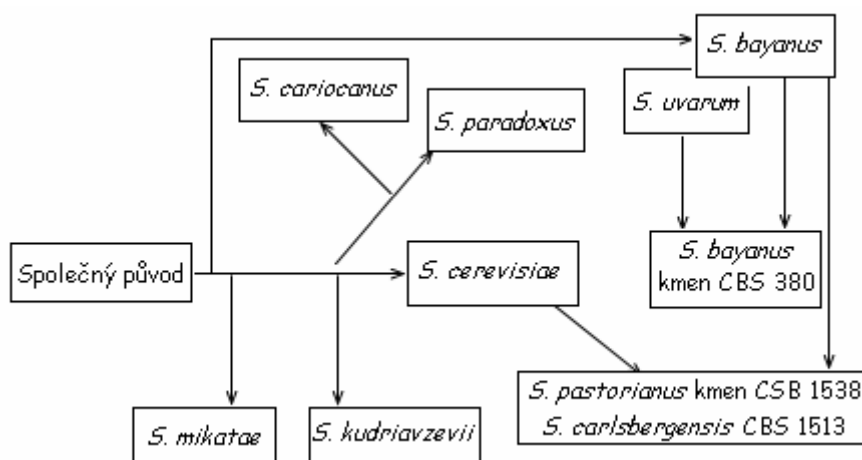
Jedním z nejznámějších druhů tohoto rodu vyskytující se ve víně je *Saccharomyces ludwigii*. Citronovité, zakřivené nebo protáhlé buňky se nepohlavně rozmnožují bipolárním pučením. Během pohlavního rozmnožování tvoří 1–4 askospory. Dokáže fermentovat glukózu, sacharózu, rafinózu, asimiluje glukózu, sacharózu, rafinózu, glycerol, kadaverin

a ethylamin. Stejně jako rod *Zygosaccharomyces* nedokáží asimilovat dusičnany. Kvasinky mohou růst v přítomnosti  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  cykloheximidu, množství  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  je už inhibiční [26].

### 2.1.7.11 Rod *Saccharomyces*

Kvasinky rodu *Saccharomyces* hrají hlavní roli při anaerobní přeměně vinného moštu na víno. Díky vysoké toleranci k ethanolu se do procesu zapojují v pozdějších stádiích fermentace. Buňky jsou kulovité, oválné nebo protáhlé. Nepohlavně se rozmnožují multilaterálním pučením, během pohlavního rozmnožování jsou tvořeny 1 – 4 elipsoidní askospory s hladkým povrchem. Kolonie na tuhých médiích jsou krémovité, ploché, někdy mohou být vypouklé. Mezi nejdůležitější druhy vyskytující se ve víně patří bezpochyby *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. Oba druhy mají schopnost fermentovat glukózu, sacharózu a rafinózu, asimilovat rovněž tyto sacharidy a navíc ještě maltózu a ethanol. Nedokáží asimilovat dusičnany a využít pětuhlíkaté cukry, jako jsou např. pentózy [26].

Taxonomie rodu *Saccharomyces* prodělala v posledních desetiletích významné změny. Rod *Saccharomyces* byl v roce 1970 rozdělen van der Waltem na *Saccharomyces sensu stricto* (v užším slova smyslu) a *Saccharomyces sensu lato* (v širším slova smyslu). Komplex *Saccharomyces sensu lato* zahrnuje druhy, které jsou vzdáleně příbuzné se *S. cerevisiae*. Jmenovitě to jsou kvasinky *S. dairensis*, *S. castelii*, *S. exiguus*, *S. servazii*, *S. unisporus*, *S. barnetti* a *S. spencerorum*. Komplex *Saccharomyces sensu stricto* (obr. 6) je tvořen sedmi druhy. Jedná se o kvasinky *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* a *S. cariocanus*. Všechny druhy jsou významné v kvasném průmyslu při výrobě vína. *Saccharomyces sensu stricto* jsou diploidní buňky, které se rozmnožují multilaterálním pučením. Při pohlavním rozmnožování tvoří 1 – 4 askospory. Za vhodných podmínek mohou sporulovat. Rozlišení a taxonomické zařazení těchto druhů použitím základních morfologických a asimilačních testů je velmi obtížné. V roce 1992 a 1993 Molina et al. navrhli identifikaci pomocí metody PCR-RFLP. Na základě použití specifických primerů a restričních endonukleáz jsme schopni tyto druhy odlišit a taxonomicky zařadit. Dalšími metodami tzv. „molekulární taxonomie“ mohou být AFLP, sekvenování, RT-PCR apod. [31, 33, 34, 35, 36].



**Obr. 6:** Schématické znázornění společného původu druhu *Saccharomyces sensu stricto* a hybridů mezi *S. cerevisiae* × *S. bayanus*, *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* [37].

### ✓ *Saccharomyces cerevisiae*

Studie rodu *Saccharomyces* má své kořeny již v roce 1838, kdy jako první kvasinka byl popsán druh *S. cerevisiae*. Podrobná charakteristika této kvasinky byla vypracována v roce 1870 [10, 36].

*S. cerevisiae* se podle své aplikace často označuje jako pivní, lihovarská, pekařská nebo vinná kvasinka. Jedná se o značně v přírodě rozšířený mikroorganismus. Často bývá používán jako modelový organismus k fyziologickým a genetickým výzkumům. Buňky jsou kulovité nebo oválné. Vegetativně se rozmnožují výhradně pučením. Mají schopnost fermentovat glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu. Trisacharid rafinózu fermentují jen z jedné třetiny, odštěpí z ní pouze fruktózu a zbývající disacharid melobióza zůstává nerozštěpena [38]. Neasimilují dusičnan a laktózu. Z fyziologických vlastností má význam zejména jejich schopnost anaerobního zkvašování hexóz na ethanol a CO<sub>2</sub> [27].

### ✓ *Saccharomyces bayanus*

*S. bayanus* je hodně podobný kvasince *S. cerevisiae*. Stejně jako *S. cerevisiae* má schopnost ve velkém množství produkovat ethanol, udává se až 18 obj.%. Fermentace probíhá v širokém teplotním rozmezí (7 – 35 °C). Zpočátku je produkce alkoholu pomalá, ale během procesu se postupně zvyšuje. Buňky vykazují vysokou osmotickou a alkoholovou toleranci a jsou rezistentní k 250 mg·l<sup>-1</sup> SO<sub>2</sub> [39, 40].

### ✓ *Saccharomyces oviformis*

Tento druh kvasinek můžeme taktéž nalézt v moštu. Buňky jsou odolné vůči vyššímu obsahu alkoholu a cukru. Jsou důležité při dokvácení moštů a při překvácení vín [32].

### ✓ *Saccharomyces cariocanus*

Tvar buněk je vejcovitý nebo kulovitý. Kvasinky se rozmnožují pučením, během pohlavním rozmnožování tvoří 2 – 4 askospory. Fermentují glukózu, galaktózu, sacharózu a rafinózu, asimilují glukózu, galaktózu, sacharózu, rafinózu, ethanol, manitol. Nedokáží asimilovat kadaverin, ethylamin, lysin a dusičnan draselný. Nerostou v přítomnosti 0,01 % cykloheximidu a 1 % kyseliny octové [41].

### ✓ *Saccharomyces kudriavzevii*

Buňky kvasinek tohoto druhu jsou vejcovité, vyskytující se jednotlivě, v párech nebo v malých skupinách. Nepohlavně se rozmnožují multipolárním pučením, během pohlavního rozmnožování jsou tvořeny čtyři askospory. Kvasinka má schopnost fermentovat glukózu, sacharózu, rafinózu a slabě maltózu. Nefermentuje laktózu, galaktózu, insulin, škrob, celobiózu, trehalózu. Glukóza, sacharóza, rafinóza, inulin, ethanol, D-manitol mohou být asimilovány, galaktóza, L-sorbóza, maltóza, celobióza, laktóza, škrob, xylóza, glycerol, D-glucitol, erythritol, sukcinát, citrát, inositol, methanol, xylitol, kadaverin, lysin, dusičnan draselný neasimilují. Buňky rostou v přítomnosti 50 % glukózy, nerostou v přítomnosti 0,01 % cykloheximidu a 1 % kyseliny octové [41].

✓ *Saccharomyces mikatae*

Kulovité nebo vejcovité buňky *S. mikatae* se vyskytují buď v páru nebo samostatně. Rozmnožování je stejné jako u druhu *S. kudriavzevii*. Buňky mají schopnost fermentovat glukózu, galaktózu, sacharózu, melobiózu, rafinózu. Maltózu, celobiózu, trehalózu, laktózu, inulin, škrob nedokáží fermentovat. Asimilují glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu, rafinózu aj. Nemají schopnost asimilovat např. laktózu, škrob, inulin, xylózu, D-arabinózu, glycerol, erythritol, kadaverin, lysin, dusičnan draselný. Rostou v přítomnosti 50 % glukózy, přítomnost 0,1 % cykloheximidu a 1 % kyseliny octové působí inhibičně [41].

## 2.2 Metody identifikace kvasinek

V roce 1912 zavedl A. Guilliermond první systém klasifikace kvasinek. Systém byl založen na sledování morfologických a několika fyziologických vlastností, jako je schopnost fermentovat monosacharidy. Následovaly mnohé studie tradičních metod taxonomického zařazování. Systém hodnocení kvasinek byl rozšířen, rostl počet fyziologických testů založených na schopnosti fermentovat a asimilovat rozmanité sloučeniny. Charakteristika se začala opírat také o biochemické znaky neboli biochemickou aktivitu kvasinek. Kritéria klasifikace byla detailně popsána van der Waltem a Yarrowem v roce 1984 a Kreeger-van Rijem v roce 1987.

Během posledních deseti let 20. století nastal značný vývoj metod molekulární biologie. Cílem aplikace nových molekulárních technik, určených k zařazení mikroorganismů, byla zejména eliminace taxonomických nejasností a možnost zjednodušení identifikace. V současné době se výzkum opírá o molekulární charakteristiku těchto mikroorganismů [36, 37, 42].

Konvenční taxonomie zahrnuje již zmiňované morfologické a fyziologické testy. Metody jsou však časově náročné a mohou poskytnout nejednoznačné výsledky. Některé znaky hodnocení kvasinek používané při tradiční taxonomii jsou uvedeny v tabulce 1. Jednou z moderních metod taxonomického zařazení kvasinek je metoda PCR-RFLP, která poskytuje spolehlivý a přesný výčet kvasinkové populace. Aplikace metody může vést ke snadnému a spolehlivému monitoringu rozvoje kvasinek během celého procesu fermentace vína, zvláště pak umožňuje identifikaci blízké příbuzných mikroorganismů, které jsou běžnými tradičními metodami obtížně taxonomicky zařazovány. Jako příklad můžeme uvést kvasinky *S. cerevisiae* a *S. bayanus*, dva nejběžněji se vyskytující druhy účastníci se fermentačního procesu. Odlišení těchto kvasinek tradičními testy je založeno pouze na jedné fyziologické charakteristice – kvasinka *S. cerevisiae* má schopnost fermentovat a asimilovat galaktózu ( $\text{Gal}^+$ ), kdežto *S. bayanus* tuto sloučeninu nevyužívá ( $\text{Gal}^-$ ). Komplikace ale tkví v metabolickém zpracování galaktózy v glykolytické dráze. *S. cerevisiae* se tedy stává  $\text{Gal}^-$ , což vede k chybné identifikaci. Díky metodám, založených na molekulární charakteristice, můžeme předejít chybné nebo nejasné identifikaci a tyto mikroorganismy spolehlivě zařadit [2, 43, 44, 45].

Souhrnně lze konstatovat, že rychlé informace o složení kvasinkové mikroflóry během procesu výroby vína pomáhají kontrolovat fermentaci a docílit tak vysoké kvality požadovaného produktu [8].



**Tab. 1:** Některá kritéria metod tradiční klasifikace kvasinek [37]

Morfologická	Fyziologická	Biochemická
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pohlavní rozmnožování</li> <li>Způsob konjugace</li> <li>Tvar spor a sporangií</li> <li>Tvorba basidiospor</li> <li>✓ Vegetativní rozmnožování</li> <li>  Pučení, dělení</li> <li>✓ Mikroskopické znaky</li> <li>  Velikost a tvar buněk</li> <li>✓ Makroskopické znaky</li> <li>  Kolonie na tuhých médiích</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Zkvašování cukrů</li> <li>✓ Asimilace uhlikatých sloučenin</li> <li>✓ Asimilace dusíkatých sloučenin</li> <li>✓ Teplota růstu</li> <li>✓ Růst při nízké <math>a_w</math></li> <li>✓ Resistence k cykloheximidu</li> <li>✓ Produkce kyseliny octové</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Složení buněčné stěny</li> <li>✓ Dlouhý řetězec MK</li> <li>✓ Izoenzymy</li> <li>✓ Typ koenzymu Q</li> </ul>

### 2.2.1 Izolace a purifikace nukleových kyselin

Nezbytným předpokladem práce s DNA je nejprve její izolace z jádra buňky. Izolace DNA vychází z chemických vlastností nukleové kyseliny. Jedná se např. o snadnou precipitaci DNA alkoholem, stabilizaci vodíkových vazeb mezi amidovými a hydroxylovými skupinami v rozsahu pH 4 – 9, chováním fosfátových esterů (silné kyseliny) při neutrálním pH (chovají se jako anionty), vlastnostmi bázi (slabě bazické a bez náboje) [46].

#### 2.2.1.1 Fenolová extrakce

Prvním a nezbytným krokem při izolaci DNA je rozrušení buněčných stěn neboli tzv. lýze buňky. Za tímto účelem se používají enzymy lyzozym, proteináza K a detergent SDS. Následuje centrifugace a extrakce DNA směsí organických rozpouštědel – fenolu a chloroformu. Opětnou centrifugací dojde k oddělení jednotlivých fází. Vzniká tak fenolová neboli organická fáze, mezifáze obsahující proteiny a vodní fáze s nukleovými kyselinami. V dalším kroku se nukleové kyseliny sráží organickými rozpouštědly. Používá se ethanol nebo izopropanol. Po centrifugaci dostaneme roztok obsahující nukleové kyseliny. Čistota vyizolovaných nukleových kyselin se stanoví spektrofotometricky měřením absorbance při 260 a 280 nm. Pokud vyizolovaná DNA není dostatečně čistá, může se ještě dále purifikovat. Cílem purifikace je odstranění RNA a denaturovaných proteinů. K odstranění přebytečné RNA se používá enzym RNáza a LiCl. Proteiny se odstraní fenolem. Taktéž lze purifikovat opětovným srážením ethanolem [46, 47].

#### 2.2.1.2 Izolace a purifikace za použití komerčních setů

Pohodlnějším, časově méně náročnějším a z hlediska čistoty izolované DNA snadnějším a výhodnějším způsobem je použití komerčních setů. Komerční sety jsou soupravy obsahující předem namíchané roztoky a vybavení potřebné pro izolaci DNA. Příkladem setu používaným pro izolaci kvasinkové DNA je UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit.

Aplikací tohoto setu dojde v prvním kroku ke koncentraci a shlukování mikrobiálních buněk a k odstranění kultivačních médií. Rozsuspendováním peletky v rozbíjecím pufru obsahujícím soli a stabilizační pufr se připraví buňky k lýze. V dalším kroku je přidán roztok

obsahující SDS a činidla nezbytná k rozrušení buňky. SDS je anionický detergent štěpící MK a lipidy buněčné membrány. Aby buňky lýzovaly a došlo tak k efektivnímu uvolnění nukleových kyselin z buňky, využívá se kombinace chemické a mechanické lýzy. Výsledkem je potom rozpadlý buněčný materiál nahromaděný na dně zkumavky a supernatant obsahující DNA, ze kterého jsou následně srážením odstraněny kontaminanty, které způsobují snížení čistoty vyizolované DNA a vedou k možné inhibici při PCR reakci. V dalším kroku se DNA naváže na filtr neboli křemičitou membránu v kolonce. Aby došlo k navázání, přidává se k supernatantu vysoce koncentrovaný solný roztok. DNA se tedy nachází v prostředí s vysokou salinitou a díky tomu dochází k její vazbě na membránu. Centrifugací se odstraní zbytek nežádoucího buněčného materiálu (RNA a denaturované proteiny). Přídavkem roztoku na bázi ethanolu dojde k purifikaci DNA navázané na filtr. Odstraní se zbytky solných příměsí a jiných kontaminantů. Aplikací elučního pufru (roztok Tris o pH = 8) je DNA uvolněna z vazby na křemičitanovou membránu. Takto vyizolovaná DNA je připravena pro další aplikace [48].

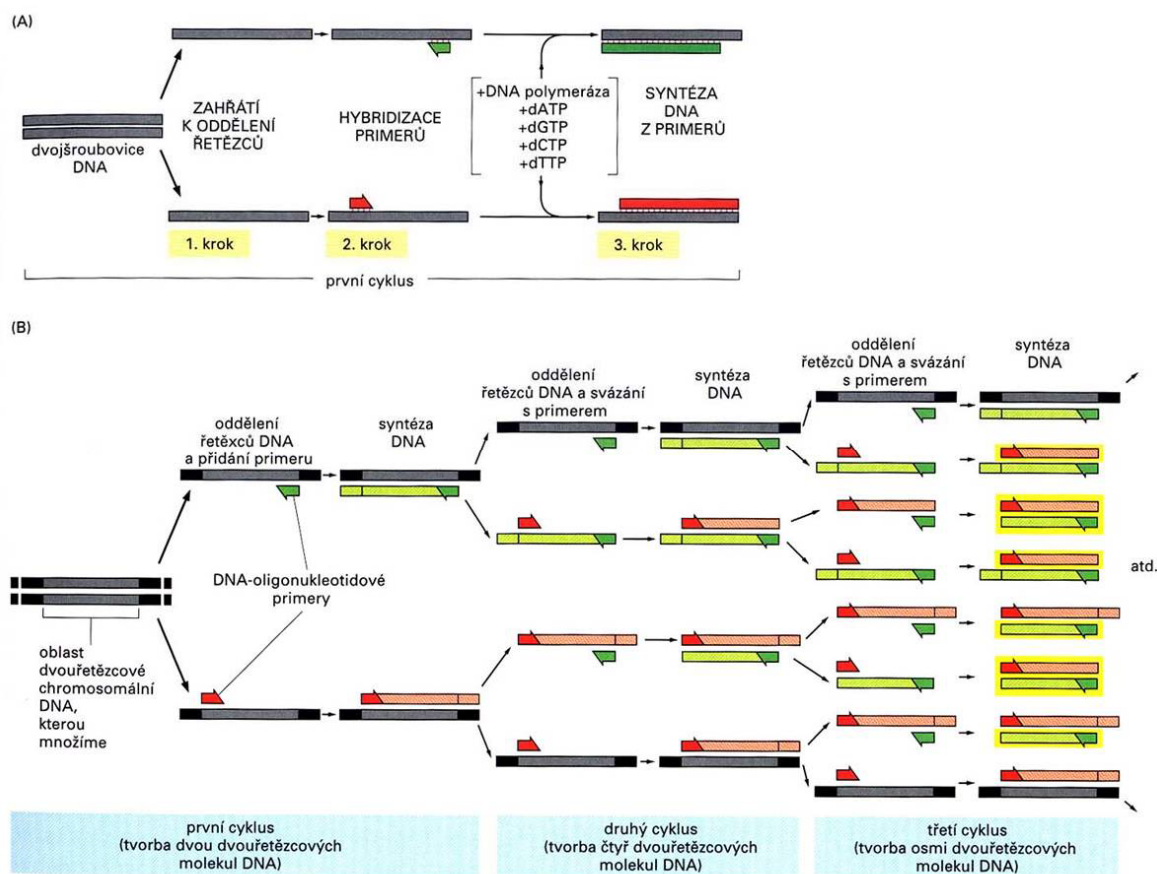
## 2.3 PCR-RFLP jako metoda taxonomického zařazení kvasinek

### 2.3.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je metoda amplifikace specifického úseku DNA *in vitro*. Tato enzymově katalyzovaná metoda má své kořeny v roce 1985, kdy byla poprvé zavedena Kary B. Mullisem. Metoda PCR je pokládána za obrovský nástroj, který učinil převrat v molekulární biologii. Objev znamenal značný posun pro biology a umožnil vykonat řadu experimentů, které byly dříve neproveditelné. Podstatou reakce je získání několika milionů kopií originální DNA během krátkého časového úseku [49, 50, 51].

#### 2.3.1.1 Princip a průběh PCR

Princip PCR (viz obr. 7) je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dsDNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA-polymerázy [36]. Amplifikace je uskutečněna ve zkumavce umístěné v termocykléru, což je programovatelný termostat schopný rychlého přechodu mezi jednotlivými teplotami. Samotný průběh reakce se skládá z pravidelně se střídajících tří kroků s odlišnými nároky na teplotu. V prvním kroku dochází k denaturaci DNA. Při teplotách 94 – 95 °C dochází ke změně struktury DNA z dvoušroubovice na jednovláknovou DNA. Teplota denaturace je závislá na obsahu G, C (spojeny třemi vodíkovými můstky), na pH, iontové síle roztoku a povaze rozpouštědla. Oddělením dvou celých vláken se zabrání opětovné renaturaci, která brání interakci s primery. Ve druhém kroku (tzv. annealing) je reakční směs ochlazená na 37 – 60 °C. Během této fáze dochází k připojení primerů k odděleným řetězcům. Následuje syntéza neboli polymerace nových řetězců DNA působením DNA polymerázy. Tento krok probíhá obvykle při 60 – 72 °C. Výsledkem je potom mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA [49, 52, 53].



**Obr. 7.** Schématické znázornění průběhu amplifikace DNA [54]

### 2.3.1.2 Komponenty potřebné pro PCR směs

Pro namnožení specifického úseku DNA jsou potřebné následující komponenty: DNA polymeráza, směs nukleotidů (dNTP), vhodné oligonukleotidové primery komplementární ke 3' koncovým sekvencím, pufr s  $Mg^{2+}$  ionty, templátová DNA [53].

#### ✓ Termostabilní DNA polymeráza

Role enzymu spočívá v katalýze syntézy komplementárního vlákna DNA. Pro tento účel se používají termostabilní DNA polymerázy, které si zachovávají svou aktivitu i při vyšších teplotách, potřebných k denaturaci DNA. Jedním z těchto enzymů je *Taq* DNA polymeráza izolovaná z termofilního mikroorganismu *Thermus aquaticus*. Teplotní optimum polymerázy je 62 – 75 °C, pH optimum se pohybuje kolem devíti. Inaktivace nastává po 40 minutách při teplotě 95 °C. Pro svoji aktivitu vyžaduje  $Mg^{2+}$  ionty. Enzym má pouze 5'→3' polymerázovou aktivitu. Výhodou enzymu je jeho vysoká procesivita neboli schopnost syntetizovat dlouhé úseky DNA o délce až 10 kb [50, 53].

Kromě *Taq* polymerázy bývají ještě používány polymerázy *Pwo*, *Pfu* získávané z mikroorganismů *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*. Výhodou aplikace těchto enzymů je kromě polymerázové aktivity i jejich exonukleázová aktivita, která umožňuje opravit chybně inkorporované deoxynukleotidy [53].

### ✓ dNTPs

Další složkou PCR směsi jsou deoxyribonukleotidy (dNTPs) sloužící jako monomery pro polymerázovou reakci. Jsou aplikovány jako ekvimolární směs dATP, dCTP, dGTP, dTTP v koncentraci 200 – 400  $\mu\text{M}$ . Nukleotidy mají velmi nízkou afinitu k templátu DNA, proto je třeba k reakční směsi přidávat primer [50, 53].

### ✓ Primery

Primery jsou krátké oligonukleotidy o délce 18 – 25 nukleotidů komplementární ke 3' koncovým sekvencím. Primery nesmí být vzájemně komplementární (tvořily by tzv. dimery) a musí být navrženy tak, aby byla zajištěna specifika reakce. To je nezbytným předpokladem pro úspěšnou reakci. Důležitá je koncentrace primerů (300 – 500 nM), vyšší koncentrace vede ke vzniku nespecifických produktů. Teplota tání obou primerů by měla být stejná a měla by se pohybovat v rozmezí 55 – 80 °C [52, 53].

### ✓ Pufr

Pufr zajišťuje optimální průběh reakce. Jeho složení musí být optimalizováno na používanou polymerázu. Původně musel obsahovat Tris-HCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$ . pH roztoku se pohybuje v rozmezí 7,3 – 8,9. K inaktivaci inhibitorů a zajištění maximální aktivity enzymu jsou do roztoku přidávány EDTA a detergenty, jako je např. Triton X-100.  $\text{Mg}^{2+}$  ionty jsou nezbytné pro úspěšnou polymerizaci. Působí jako kofaktor DNA polymerázy [55].

## 2.3.2 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů u PCR produktů

Metoda PCR-RFLP je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, obsahujícího sekvenční polymorfismus [49]. Jedná se o tzv. restrikční mapování DNA fragmentů [56]. Nepatrné změny v DNA, individuální pro každý organismus, činí jeden organismus odlišným od jiného. RFLP je technika, ve které odlišnosti v DNA mezi jednotlivci v populaci jsou identifikovány na základě restrikčních fragmentů získaných enzymovým štěpením příslušné DNA. Princip RFLP spočívá v digesci amplikonu s restrikční endonukleázou rozpoznávající čtyři až osm párů bazí [2, 57]. DNA odlišných jedinců je tedy naštípána restrikčním enzymem. Vznikají fragmenty rozdílné délky, jejichž obraz je specifický pro každého jedince populace. Podobnosti a odlišnosti mohou být tedy využity k rozlišení druhů a kmenů. Naštípané fragmenty DNA jsou elektroforeticky děleny, následně vizualizovány a vyhodnoceny [26, 58].

V roce 1998 použil Guillamón et al. tuto metodu k identifikaci vinných kvasinek. Metoda je popisována jako rychlá, spolehlivá metoda molekulární charakteristiky kvasinek s možným průmyslovým využitím, schopná charakterizovat tyto mikroorganismy na základě rodu a druhu [59, 60].

Oblast genu rDNA zahrnuje vysoce chráněnou oblast 5·8S rRNA a variabilní zónu, ve které je oblast ITS. Oblast genu mezi 18S rRNA a 28S rRNA může být amplifikována použitím specifických primerů ITS1 a ITS4 [42]. Po amplifikaci získáme tzv. amplifikovanou oblast 5·8S-ITS rDNA, která je dále podrobena restrikční analýze. Opakující se jednotka

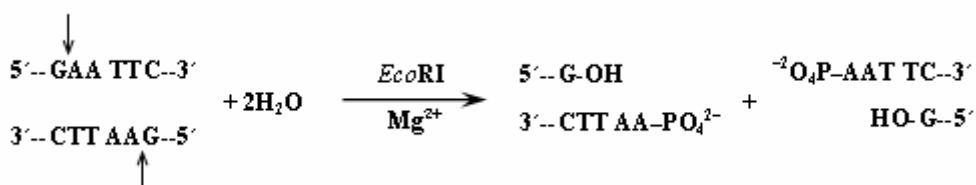
kvasinkové rDNA je schématicky znázorněna na obr. 8. Obrázek taktéž poukazuje na použití primerů pro různé sekvence rDNA.



**Obr. 8:** Schématické znázornění použití primerů pro různé sekvence rDNA.

NS1-NS8: 18-S rDNA; NS1-ITS2: 18-S-ITS1 sekvence; ITS1-ITS4: ITS1-5-S rDNA-ITS2 sekvence; NL1-NL4: oblast D1/D2 26-S rDNA [37]

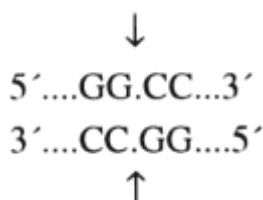
Enzymy používané k naštipání DNA na fragmenty specifické pro daný druh, se nazývají restriční endonukleázy a řadí se mezi hydrolázy. K rozštěpení molekuly DNA dochází hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v restričním místě neboli místě štěpení, které se nachází uvnitř rozpoznávacího místa nebo těsně vedle něj [49]. Vznikají úseky DNA definované délkou nazývané restriční fragmenty. Ukázka štěpení molekuly DNA, za použití restriční endonukleázy *EcoRI*, izolované z bakterie *Escherichia coli* RY 13, je na obrázku 9 [49, 61].



**Obr. 9:** Schématické znázornění štěpení molekuly DNA za použití restriční endonukleázy *EcoRI* [61]

Enzymy jsou klasifikovány jednotným názvoslovím navrženým Smithem a Nathanem. Každá RE je pojmenovaná tři písmenkovým kódem. První písmeno udává počáteční písmeno rodu, ze kterého je enzym izolován, druhé a třetí značí první dvě písmena produkčního druhu. Jako příklad jedné běžně používané RE můžeme uvést enzym *HaeIII* rozpoznávající sekvenci 5' GGCC 3'. Specifické štěpné místo je znázorněno na obr. 10. Producentem enzymu je bakterie *Haemophilus aegypticus*  $\Rightarrow$  *HaeIII*. Římskou číslicí se potom odlišuje více enzymů produkovaných jedním mikroorganismem [49, 62, 63].

V současné době je charakterizováno několik typů RE, z nichž nejvýznamnější jsou RE II. typu (II. třídy). Je známo více než 3 500 těchto endonukleáz [49].

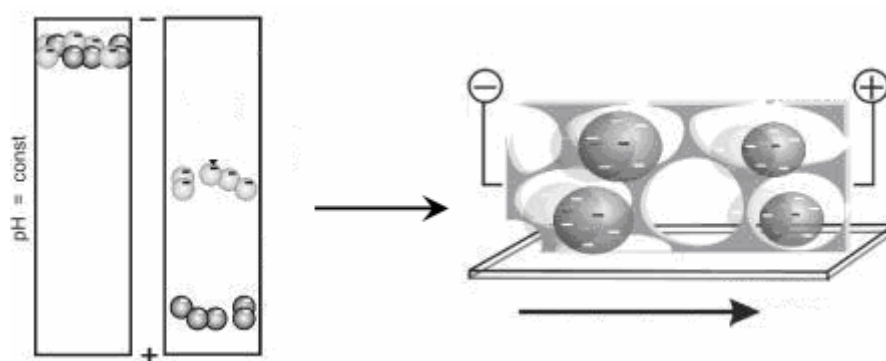


**Obr. 10:** Znázornění specifického štěpného místa restriční endonukleázy *HaeIII* v molekule DNA [63]

### 2.3.3 Detekce nukleových kyselin

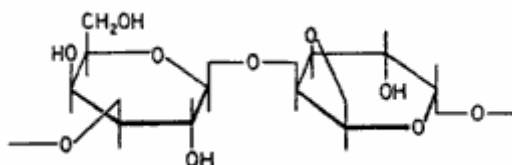
Metoda separace a analýzy DNA – **gelová elektroforéza** – je označována za jednu z metod započínající revoluci v molekulární biologii. Kořeny sahají do roku 1937, kdy byla poprvé Tisellem rozdělena směs bílkovin. Za tento objev později obdržel Nobelovu cenu. Jedná se o snadno prakticky aplikovatelnou chromatografickou metodu [53, 64, 65].

Elektroforetické neboli elektromigrační metody jsou separační metody založené na pohybu nabitých částic (v našem případě molekuly DNA) v elektrickém poli. Pokud jsou částice, nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, začnou se pohybovat konstantní rychlostí úměrnou velikosti jejich nábojů, anionty k anodě, kationty ke katodě [53]. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny [49]. Molekuly se tedy pohybují od katody (–) k anodě (+). Pohyb molekul je znázorněn na obrázku 11.



**Obr. 11:** Pohyb negativně nabitých molekul DNA v elektrickém poli [64]

Vhodnými nosiči určenými k separaci nukleových kyselin jsou gely. V praxi se používají agarózový a polyakrylamidový. Gely tvoří složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Rozdíl v aplikaci těchto gelů souvisí s velikostí separovaných molekul. Polyakrylamidové gely se používají k dělení menších molekul o velikosti 10 – 1000 bp, agarózový gel pro separaci molekul o velikosti 100 bp – 50 kb. Podle polohy gelu v elektroforetické vaně rozdělujeme elektroforézu na horizontální a vertikální. Nukleové kyseliny, v našem případě DNA, jsou děleny v agarózovém gelu [49]. Agaróza, jejíž struktura je znázorněna na obr. 12, je polysacharid tvořený  $\beta$ -D-galaktopyranózou a 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galaktopyranózou. Aby vznikl z agarózy gel, je nutné její rozpuštění ve vřoucím vodném roztoku a následné ochlazení na teplotu místnosti. Matrix agarózového gelu je udržována vodíkovými vazbami [66, 67].



**Obr. 12:** Struktura agarózy. Kopolymer  $\beta$ -D-galaktopyranózy a 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galaktopyranózy spojený glykozidovými vazbami [65]

Jelikož separované molekuly nejsou pouhým okem viditelné, je třeba po dokončení elektroforézy tyto fragmenty identifikovat. Molekuly DNA lze snadno zviditelnit interakcí molekuly s interkalačním barvivem ethidium bromidem. Barvivo se vmezeřuje mezi sousední páry bází, vytváří komplex s DNA a po osvětlení UV světlem následně fialově fluoreskuje. Výsledkem jsou potom patrné proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA [49].

## 2.4 Jiné možnosti identifikace kvasinek založené na molekulárně biologických metodách

Identifikace a charakteristika kvasinek prodělala v posledních letech výrazné změny. Byly zavedeny molekulární metody taxonomického zařazování, které mají nahradit tradiční testy a usnadnit tak identifikaci těchto mikroskopických organismů. Metody lze tedy pokládat za tzv. „moderní taxonomii“. Průmysl se rozvíjí a vyžaduje rychlé, jednoduché a spolehlivé metody identifikace mikroorganismů. Analýza amplifikované oblasti 5·8S-ITS rDNA použitím metody RFLP je sice účinným nástrojem v oblasti hodnocení a klasifikace mikroorganismů, nicméně ne příliš snadno proveditelnou metodou. Vyžaduje totiž dva kroky. Nejprve je potřeba amplifikovat vyizolovanou DNA a poté amplikon teprve podrobit restriční analýze. Metoda PCR nám sice umožní částečně identifikovat kvasinky, ale pro druhové zařazení je nezbytná metoda RFLP. Moderní klasifikace kvasinek se tedy stále rozvíjí a to zejména za účelem zjednodušení. Jsou zkoumány a aplikovány nové metody. Jedná se zejména o různé modifikace metody PCR. Jako příklad můžeme uvést tři techniky, které jsou hodnoceny kladně z hlediska rychlosti, jednoduchosti a relativní levnosti. Jmenovitě je to PCR-ISS, ERIC-PCR a REP-PCR. V současné době se tyto techniky používají k monitoringu rozmanitosti kvasinek během průmyslové fermentace vína.

Za účelem zkrácení doby identifikace jsou vyvíjeny metody, které nevyžadují předchozí kultivaci mikroorganismů na tuhých médiích. Doba identifikace se tedy zkracuje alespoň o tři dny.

Další metodou používanou k identifikaci kvasinek na úrovni druhů je tzv. PCR-fingerprinting. Metoda je založena na použití jednoduchých primerů (SPAR). Příkladem primerů jsou např. (GAC)<sub>5</sub>, (GTG)<sub>5</sub>. PCR-fingerprinting může být použitý k odlišení kvasinek náležících do skupiny *Saccharomyces sensu stricto* (popsána v kapitole 2.1.7.11). Jak už bylo nastíněno v předchozích kapitolách, jsou tyto kvasinky běžnými tradičními metodami od sebe jen těžce odlišitelné. Metoda v kombinaci s PCR-RFLP může efektivně identifikovat jednotlivé druhy a kompletně charakterizovat směsice kvasinek. Unikátní obraz vytvořený použitím SPAR markerů může být použitý při monitoringu populace kvasinek během průmyslového fermentačního procesu. Použitím markerů může být tedy komplex *Saccharomyces sensu stricto* odlišen [35, 68, 69].

Rychlé identifikace a výčtu kvasinkové populace může být dosaženo použitím metody RT-PCR. Podstatou reakce je detekce fluorescenčně značených amplifikovaných DNA fragmentů monitoringem fluorescenční odezvy během procesu. Používá se nespecifické barvivo SYBR green. Aplikace metody vede k rychlé a citlivé detekci a ke stanovení množství mikroorganismů. Výhodou je vyhnutí se digesci a elektroforetickým detekcím [70].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie, přístroje a pomůcky

#### 3.1.1 Mikroorganismy

Mikroorganismy pocházejí ze sbírky mikroorganismů CCY – Culture Collection of Yeasts; Bratislava, SR:

*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces mangini*, *Saccharomyces aceti*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces steineri*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Kluyveromyces lactis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora vineae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula graminis*, *Sporidiobolus roseus*, *Sporidiobolus pararoseus*, *Sporidiobolus salmonicolor*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia fermentans*, *Pichia subpelliculosa*, *Pichia guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis*.

Kvasinky vyizolované z bílého vína z oblasti Velkých Pavlovic, soukromý vinař p. Šťavík, izolace – září 2007.

#### 3.1.2 Chemikálie

- Agar, kvasniční extrakt (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie)
- Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon spol.s.r.o., ČR)
- Sladina (pivovar Brno)
- Quant-iT™ ds DNA HS Assay Kit 0,2 – 100 ng
- Agaróza pro elektroforézu DNA EliPhore (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- Ethidium bromid (Serva Bitech, Německo)
- Taq DNA polymerasa (Invitek, Německo)
- 10× Taq pufr pro PCR mix (Invitek, Německo)
- Primery ITS1, ITS4 (Invitek, Německo)
- dNTP mix (Invitek, Německo)
- Nanášecí pufr Loading buffer (Fermentas, Litva)
- Délkový standard 20 bp a 100 bp a 100 plus bp (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)
- Restrikční endonukleasy – *Taq*<sup>α</sup>I, *Hinf*I, *Hha*I, *Hpa*II, *Alu*I, *Mse*I, *Hae*III (BioLabs, TaKaRa)
- Ethanol, EDTA, Tris, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, NaOH, CH<sub>3</sub>COONa, HCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Parafínový olej
- Sterilní a deionizovaná voda

#### 3.1.3 Přístroje a pomůcky

- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- Centrifuga eppendorf 5417 R (Eppendorf AG, Německo)



- Vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR)
- Vortex-Genie 2, MO Bio (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)
- Termostat IP 100-U LTE SCIENTIFIC, (Velká Británie)
- Termocyklér PTC-100TM, (MJ Research, Inc, USA)
- PCR box- AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR)
- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Elektroforetická vana (Owl separation systeme, model - B2, (Biotech s.r.o., ČR)
- Předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Transluminátor (Ultra Lum. INC, USA)
- Software Scion Image (Biotech s.r.o., ČR)
- Třepačka (Heidolph, Německo)
- Spektrofotometr DU 7400 (Beckman, USA)
- NanoPhotometer<sup>TM</sup> UV/Vis (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Qubit<sup>TM</sup> Fluorometer (Invitrogen<sup>TM</sup>)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci
- Lednice a mražák k uchování vzorků DNA
- Parafilm (American Nacional Can<sup>TM</sup>, USA)
- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- Mikrozukmavky Eppendorf
- Plastové Petriho misky
- Bakteriologické kličky
- Buničitá vata
- Stojan
- Kahan

## 3.2 Kultivační média a roztoky

### 3.2.1 Příprava kultivačního média

Jako kultivační médium byl použitý sladivový extrakt, který byl připraven následujícím způsobem. Do odměrného válce o objemu 500 ml bylo nalito 200 ml sladiny. Roztok byl zředěn vodou na cukernatost 7 °ČSN, uhličitanem sodným bylo upraveno pH na 6,8. K takto připravenému roztoku nalitému do Erlenmayerových baněk byl přidán agar, vzniklá směs byla promíchána varem a 20 minut sterilizována. Kultivační médium bylo následně nalito do Petriho misek a jako šikmé agary do zkumavek. Na celou plochu agarů v Petriho misce byly naočkovány kvasinky, které byly následně kultivovány v termostatu po dobu tří dnů při teplotě 26 °C.

### 3.2.2 Příprava 10×TBE pufu

Nejprve byl připraven 0,5 M roztok EDTA. Roztok EDTA o pH 8 byl připraven tak, že 9,36 g EDTA bylo převedeno do 50 ml odměrné baňky. pH bylo upraveno 0,5% roztokem NaOH. Z takto připraveného roztoku bylo odebráno 40 ml a nalito do 1000 ml odměrné

baňky. K tomuto roztoku bylo přidáno 108 g Tris a 55 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Vše bylo rozpuštěno v destilované vodě a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Tímto způsobem byl připraven tzv. zásobní roztok.

### **3.2.3 Příprava 1×TBE pufru**

Z připraveného zásobního roztoku bylo do 1000 ml odměrné baňky odměřeno 100 ml tohoto roztoku a doplněno po rysku destilovanou vodou. Takto byl připraven 1×TBE pufr, který byl použitý k přípravě gelů.

### **3.2.4 Příprava 1×TBE pufru s ethidium bromidem**

K připravenému roztoku 1×TBE pufru v 1000 ml odměrné baňce bylo přidáno 100 μl ethidium bromidu. Takto připravený roztok byl použitý jako vodivostní pufr při elektroforetické detekci DNA fragmentů.

### **3.2.5 Příprava EtBr**

10 mg ethidium bromidu bylo naváženo do mikrozkušavky eppendorf a rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Ethidium bromid byl použitý pro vizualizaci fragmentů DNA na gelu.

### **3.2.6 Příprava délkových standardů 100 bp a 20 bp**

#### **✓ 100 bp**

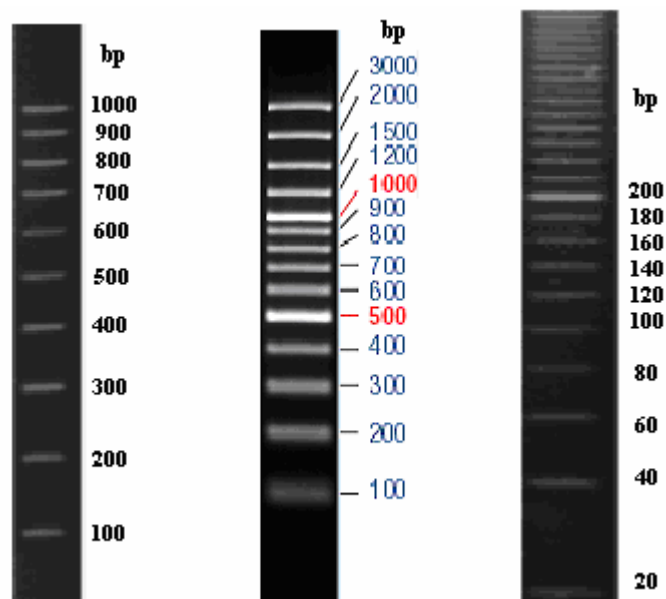
Délkový standard 100 bp byl připraven smícháním 10,9 μl sterilní vody, 2,5 μl nanášecího pufru a 1,6 μl roztoku 100 bp. Z takto připraveného roztoku bylo nanášeno na gel 7 μl.

#### **✓ 100 bp plus**

Standard 100 bp plus byl dodán v již připravené formě. Na gel byly nanášeny 3 μl roztoku.

#### **✓ 20 bp**

Délkový standard 20 bp byl připraven tak, že bylo smícháno 4,25 μl sterilní vody, 1 μl nanášecího pufru a 0,75 μl roztoku 20 bp. Takto připravený délkový standard byl aplikován na gel v množství 6 μl.



*Obr. 13: Použité délkové standardy (označení M – markery) a velikost jednotlivých fragmentů v markeru. Zleva: délkový standard 100 bp, 100 bp plus, 20 bp [71, 72, 73].*

### 3.2.7 Příprava 2% agarózového gelu

Do Erlenmayerovy baňky byly naváženy 3 g agarózy a zality 150 ml 1×TBE pufru. Směs byla dokonale rozpuštěna v mikrovlnné troubě.

### 3.2.8 Příprava 3 M octanového pufru

2,46 g CH<sub>3</sub>COONa bylo rozpuštěno v destilované vodě, pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na 5,5. Roztok byl kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Připravený roztok byl uchován při 4 °C.

### 3.2.9 Příprava 80% ethanolu

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

### 3.2.10 Příprava PCR směsi

PCR směs byla připravena smícháním následujících komponent:

sterilní voda.....	123 μl
pufr.....	15 μl
dNTP mix.....	3 μl
primer ITS1.....	1,5 μl
primer ITS4.....	1,5 μl

---

**144 μl**

K celkovému množství 144  $\mu\text{l}$  připravené směsi byly přidány 3  $\mu\text{l}$  templátové DNA a 3  $\mu\text{l}$  termostabilní DNA polymerázy. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem, ale místo templátové DNA byly k reakční směsi přidány 3  $\mu\text{l}$  sterilní vody.

### 3.3 Pracovní postupy

#### 3.3.1 Izolace DNA

Izolace kvasinkové DNA byla provedena za použití komerčního setu UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit.

Do rozbíjecí zkumavky bylo pipetováno 300  $\mu\text{l}$  rozbíjecího pufu, ve kterém byla následně rozsuspendována dvě očka kvasinkové kultury. Ke směsi bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  roztoku MD1 a vše bylo jemně zvortexováno. Mikrozkumavky byly vloženy v horizontální poloze do adaptéru vortexu a při maximální rychlosti byly 10 minut vortexovány. Poté byly centrifugovány 1 minutu při 10000 $\times$ g. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkumavky, k roztoku bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  MD2, směs byla zvortexována a inkubována 5 minut při 4 °C. Po opětovné centrifugaci (1 minutu při 10000 $\times$ g) byl supernatant přenesen do čisté mikrozkumavky, k roztoku bylo přidáno 900  $\mu\text{l}$  MD3 a směs byla zvortexována. 700  $\mu\text{l}$  takto vzniklého roztoku bylo přeneseno na kolonku, centrifugováno (1 minutu při 10000 $\times$ g). Přefiltrovaný roztok byl odstraněn, na tutéž kolonku byl přenesen zbytek roztoku a kolonka s roztokem byla opět centrifugována (1 minutu při 10000 $\times$ g). Přefiltrovaný roztok byl odstraněn, do kolonky bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  roztoku MD4 a centrifugováno 1 minutu při 10000 $\times$ g. Kolonka byla opatrně přenesena do čisté mikrozkumavky, do středu bílé membrány uvnitř kolonky bylo napipetováno 50  $\mu\text{l}$  roztoku MD5 a následně zcentrifugováno (1 minutu při 10000 $\times$ g). Kolonka byla odstraněna a roztok DNA v mikrozkumavce byl připraven pro další aplikace. Roztok byl uchován při -20 °C.

#### 3.3.2 PCR

K celkovému množství 144  $\mu\text{l}$  připravené směsi (viz příprava mastermixu, kapitola 3.2.10) byly přidány 3  $\mu\text{l}$  templátové DNA a 3  $\mu\text{l}$  termostabilní DNA polymerázy. Směs byla zvortexována, vložena do termocykléru, kde byla namnožena pomocí polymerázové řetězové reakce. Teplotní a časový profil reakce je uveden v tab. 2.

#### Podmínky reakce:

*Tab. 2: Teplotní a časový profil PCR [74]*

Jednotlivé kroky	Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace	94	4
Annealing – 25 cyklů	94	1
	48	0,5
	72	1
Elongace	72	10

K amplifikaci oblasti 5·8S-ITS rDNA byly použity primery ITS1 a ITS4. Primery byly dodány v lyofilizované formě a před použitím je bylo nutno rozpustit ve sterilní vodě. Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tab. 3:** Použité primery a jejich sekvence [11]

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

### 3.3.3 Elektroforetická detekce PCR produktu

PCR produkt byl následně detekován za použití horizontální elektroforézy na 2% agarózovém gelu. Podle počtu analyzovaných vzorků byly použity různé velikosti van ( velká, malá a nejmenší elektroforetická vana). Gel na velkou vanu byl připraven v množství 60 ml, malou vanu v množství 40 ml a nejmenší 30 ml gelu. Ke gelu byl přidán ethidium bromid (v  $\mu$ l) – v množství odpovídajícím 1/10 objemu gelu.

Vzorky byly na gel nanášeny následujícím způsobem: 1  $\mu$ l nanášecího pufru bylo smícháno s 5  $\mu$ l vzorku a 5  $\mu$ l této směsi bylo pipetováno do jamky na gelu. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem a nanášena ve stejném množství. Po okrajích gelu byly vždy vyneseny délkové standardy 100 bp plus nebo 100 bp v množství uvedeném v kapitole 3.2.6.

#### Podmínky elektroforézy:

##### ✓ Velká elektroforetická vana

Dělení fragmentů při konstantním napětí 65 V po dobu 2 hodin při použití délkového standardu 100 bp a 2,5 – 3 hodiny při použití délkového standardu 100 bp plus (kvůli dobrému rozdělení standardu).

##### ✓ Malá elektroforetická vana

Dělení fragmentů při konstantním napětí 55 V po dobu 2 hodin.

##### ✓ Nejmenší elektroforetická vana

Dělení fragmentů při konstantním napětí 45 V po dobu 2 hodin.

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

### 3.3.4 Přečištění PCR produktu

Před restrikční analýzou bylo potřeba PCR produkt přečistit. PCR produkt byl přečištěn následujícím způsobem. 20  $\mu$ l amplifikované DNA bylo smícháno s 2  $\mu$ l octanového pufru. Směs byla zvortexována a ke směsi bylo přidáno 60  $\mu$ l 96% ethanolu vychlazeného

na teplotu – 20 °C. Následovala centrifugace po dobu 30 min. při 4 °C a 15 000 otáčkách. Supernatant byl dekantován, do mikrozkušavky bylo přidáno 60 µl 80% ethanolu, obsah byl zvortexován a opět při stejných podmínkách centrifugován. Supernatant byl dekantován a mikrozkušavky byly zbaveny zbytku ethanolu vysušením v exsikátoru po dobu 15 minut.

### 3.3.5 Restrikční analýza

K přečištěné DNA bylo pipetováno 13 µl sterilní vody, 1,5 µl pufru a 0,5 µl enzymu. U enzymu *HhaI*, *HpaII* bylo k přečištěné DNA pipetováno 20 µl sterilní vody, 2 µl pufru a 1 µl enzymu. Vzorky byly následně inkubovány při 37 °C po dobu 16 hodin (+ 20 minut inaktivace enzymu) a poté elektroforeticky detekovány stejným způsobem jako PCR produkty. Místo negativní kontroly byla na gel vynášena pozitivní kontrola. Jako pozitivní kontrola byly na gel naneseny PCR produkty o délce shodující se s délkou ampliconu, který byl použitý pro restrikční analýzu.

**Tab. 3:** Vlastnosti jednotlivých restrikčních endonukleáz použitých k taxonomickému zařazení kvasinek [71, 72]

Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo na sekvenci DNA 5' → 3' 3' ← 5'	$t_{\text{inkubace}}$ (°C) 16 hodin	$t_{\text{inaktivace}}$ (°C) 20 minut
<b><i>HaeIII</i></b>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	GG↓CC CC↑GG	37	80
<b><i>Taq<sup>o</sup>I</i></b>	<i>Thermus aquaticus</i>	T↓CGA AGC↑T	37	80
<b><i>HhaI</i></b>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCG↓C C↑GCG	37	80
<b><i>HpaII</i></b>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	C↓CGG GGC↑C	37	65
<b><i>HinfI</i></b>	<i>Haemophilus influenzae</i>	G↓ATC CTA↑G	37	80
<b><i>MseI</i></b>	<i>Micrococcus</i> species	T↓TAA AAT↑T	37	65
<b><i>AluI</i></b>	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG↓CT TC↑GA	37	65

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Příprava typových kvasinek

Jako typové kvasinky byly použity kvasinky pocházející ze sbírky CCY (Bratislava, SR). Seznam typových kvasinek je uvedený v příloze 1. V práci jsou dále uváděna pouze jejich pracovní označení.

Ze 63 typových kvasinek byla vyizolována DNA, která byla následně naamplifikována a podrobena restriční analýze. S výsledným obrazem velikosti restričních fragmentů typových kvasinek byly následně porovnávány stejným způsobem připravené vzorky kvasinek vyizolované z vína v roce 2007 (kapitola 4.2). Získaný obraz enzymového štěpení amplifikované DNA typových kvasinek sloužil dále jako kritérium pro taxonomické zařazení kvasinek izolovaných z vína.

Pro posouzení genetické podobnosti slouží vytvořené dendogramy, které byly sestaveny na základě výsledků RFLP pro všechny použité enzymy.

#### 4.1.1 Kultivace kvasinek

Po zaočkování kvasinek na předem připravený sladidový agar, byly Petriho misky inkubovány v termostatu při teplotě 26 °C po dobu tří dnů. Po kultivaci byla z buněk vyizolována DNA.

#### 4.1.2 Izolace DNA

DNA z jádra buňky byla vyizolována za použití komerční sady Ultra Clean<sup>TM</sup> Microbial DNA Isolation Kit. Souprava byla zvolena za účelem snadné a rychlejší izolace většího množství vzorků a z hlediska vyšší čistoty DNA.

Koncentrace vyizolované DNA se pohybovala v rozmezí 5 – 40 ng·μl<sup>-1</sup>. Vyizolovaná DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C a následně použita k amplifikaci a restriční analýze.

#### 4.1.3 Amplifikace DNA pomocí PCR

Pro namnožení specifického úseku DNA byla zvolena kódující oblast 5·8S-ITS rDNA, která byla naamplifikována použitím nespecifických primerů ITS1 a ITS4. PCR produkt neboli amplikon byl následně elektroforeticky detekován na 2% agarózovém gelu. Aby mohly být jednotlivé délky fragmentů PCR produktů co nejpřesněji odečteny, bylo třeba, aby podmínky elektroforézy byly následující: velká elektroforetická vana, 2% agarózový gel, konstantní napětí 65 V, doba dělení nejméně tři hodiny. Pro velmi kvalitní rozdělení délkového standardu a tudíž k přesnějšímu odečtení délek PCR fragmentů je třeba nechat elektroforézu běžet zhruba čtyři hodiny. Ukázka dělení fragmentů v závislosti na čase je znázorněna na obr. 14. Na tomto obrázku je viditelný rozdíl rozdělení délkového standardu. Díky lepšímu rozdělení standardu 100 bp plus byly přesněji odečteny délky amplifikovaných DNA fragmentů pro jednotlivé rody typových kvasinek. Velikost PCR produktu byla stanovena odečtením z elektroforeogramu a následně také určena pomocí programu BioNumerics.

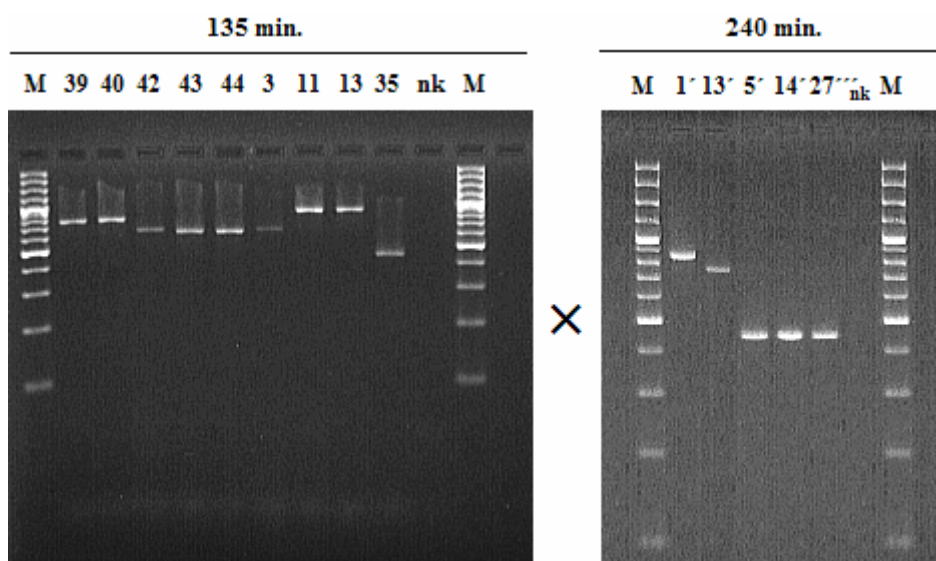
Amplifikací DNA jednotlivých typových kvasinek byly získány délky fragmentů 450 bp, 500 bp, 650 bp, 750 bp, 880 bp a 900 bp. U vzorků s28 a s35 (*Hanseniaspora uvarum*) je délka amplifikovaného fragmentu 450 bp, u ostatních kvasinek rodu *Hanseniaspora* je velikost PCR produktu 750 bp. Kvasinky rodu *Saccharomyces* poskytují jednotnou velikost fragmentu a to 880 bp. 900 bp přísluší rodu *Kluyveromyces*. Amplifikací DNA izolované z jádra buněk kvasinek rodu *Pichia* byly získány 3 délky fragmentů – 450 bp, 600 bp, 650 bp, velikost amplikonu DNA kvasinek rodu *Rhodotorula* se pohybuje kolem 650 bp.

Délky jednotlivých fragmentů jsou uvedeny v tabulce 4. Ukázka 2% agaróзовého gelu s PCR produkty typových kvasinek je na obr. 15. Je zde ukázán obraz vybraných PCR produktů o délce 450, 750, 650, 880 a 900 bp.

**Tab. 4:** Velikost amplifikované oblasti 5-8S-ITS rDNA jednotlivých typových kvasinek za použití primerů ITS1 a ITS4.

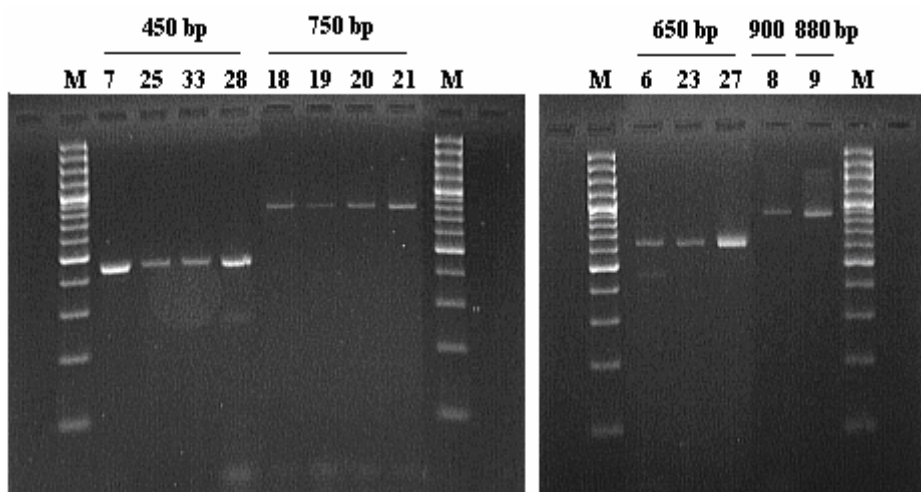
Pracovní označení	Velikost amplikonu (bp)	Pracovní označení	Velikost amplikonu (bp)	Pracovní označení	Velikost amplikonu (bp)
s8	900	s16	750	s31	650
s9	880	s17	750	s50	650
s10	880	s18	750	s51	650
s11	880	s19	750	s52	650
s12	880	s20	750	s53	650
s13	880	s21	750	s54	650
s14	880	s26	750	s55	650
s45	880	s29	750	s32	650
s46	880	s36	750	s42	650
s47	880	s15	750	s43	650
s48	880	s39	750	s27	650
s49	880	s40	750	s23	650
s56	880	s34	650	s30	650
s24	880	s37	650	s38	650
s58	880	s1	650	s44	600
s59	880	s2	650	s57	500
s60	880	s3	650	s28	450
s61	880	s4	650	s35	450
s62	880	s5	650	s7	450
s63	880	s6	650	s25	450
		s41	650	s33	450





**Obr. 14:** Ukázka dělení fragmentů DNA v závislosti na čase. Dělení v 2% agarózovém gelu při konstantním napětí 65 V. Elektroforeogram vlevo: doba dělení 135 min., elektroforeogram vpravo: doba dělení 240 min.

*M* – délkový standard 100 bp plus, *nk* – negativní kontrola. Čísla značí pracovní označení vzorků kvasinek (elektroforeogram vlevo: typové kvasinky; elektroforeogram vpravo: vzorky kvasinek izolovaných z vína).



**Obr. 15:** Elektroforeogram PCR produktu získaného amplifikací 5-8S-ITS oblasti rDNA u typových kvasinek.

*M* – marker, neboli délkový standard 100 bp plus. *s7*, *s25*, *s33*, *s28*, *s18*, *s19*, *s20*, *s21*, *s6*, *s23*, *s27*, *s8*, *s9* – pracovní označení běhů amplifikované DNA jednotlivých typových kvasinek.

#### 4.1.4 Restrikční analýza (PCR-RFLP)

Naamplifikovaná DNA byla následně přečištěna (přesrážena ethanolem za účelem odstranění přebytečných složek PCR směsi a získání čisté DNA) a podrobena restrikční analýze. Pro naštipání DNA na specifické fragmenty bylo použito sedm enzymů – *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII*, *Taq<sup>o</sup>I*, *MseI*, *AluI*. Podmínky digesce a postup je uveden v kapitole 3.3.5.

V práci nejsou uvedeny všechny výsledné gely z hlediska jejich velkého množství, ale u každého enzymu je uvedena souhrnná tabulka s délkami restrikčních fragmentů získaných enzymovým štěpením DNA a elektroforeogramy s ukázkami štěpení typových kvasinek.

##### 4.1.4.1 Enzym *HaeIII*

Jako jedna z restrikčních endonukleáz byl zvolen enzym *HaeIII*, který rozpoznává a štěpí místo 5' GG↓CC 3' DNA. Délky fragmentů po digesci tímto enzymem jsou uvedeny v tabulce 5. Ukázka štěpení enzymu pro vybrané druhy typových kvasinek je na obr. 16.

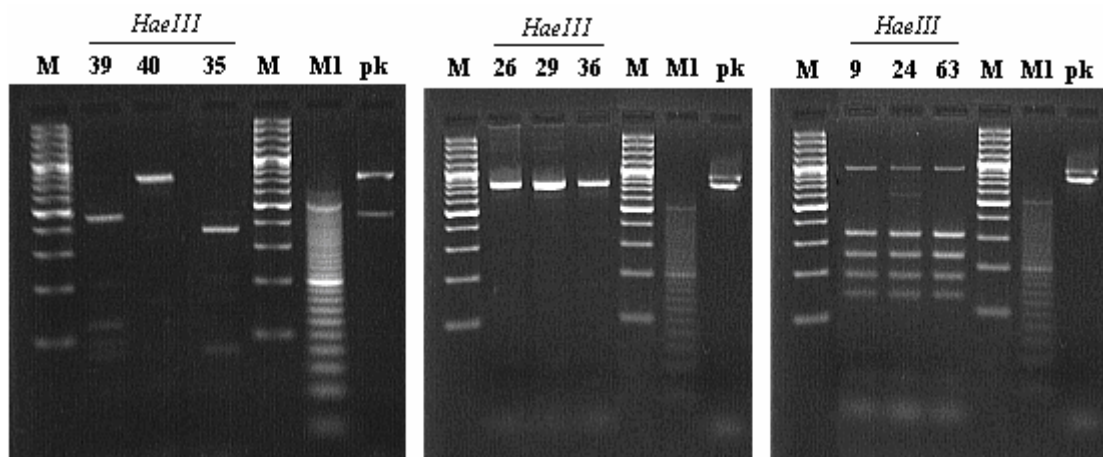
**Tab. 5:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HaeIII*.

*PO* – pracovní označení typové kvasinky, *AP* – velikost amplifikovaného produktu v bp, *RF* – velikost restrikčního fragmentu v bp, *n* – neštěpeno, *O* – ostatní vinné kvasinky.

	PO	AP (bp)	RF (bp)		PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Hanseniaspora</i>	s28	450	380+70	Rod <i>Rhodotorula</i>	s1	650	n
	s35	450	380+70		s4	650	n
	s16	750	n		s5	650	n
	s17	750	n		s6	650	n
	s18	750	n		s23	650	n
	s19	750	n		s50	650	n
	s20	750	n		s51	650	n
	s21	750	n		s53	650	n
	s26	750	n		s54	650	n
	s36	750	n		s41	650	n
	s15	750	n		s52	650	450+240
	s40	750	n		s55	650	450+240
	s29	750	n		s27	650	420+220
Rod <i>Saccharomyces</i>	s39	750	450+120+100+80	s31	650	420+220	
	s24	880	310+240+170+130	s32	650	420+220	
	s8	900	310+240+170+130	s2	650	400+220	
	s9	880	310+240+170+130	s3	650	400+220	
	s10	880	310+240+170+130	s42	650	400+220	
	s11	880	310+240+170+130	s43	650	400+220	
	s12	880	310+240+170+130				
	s13	880	310+240+170+130				

Tab. 5: Pokračování.

Rod <i>Saccharomyces</i>	PO	AP (bp)	RF (bp)	Rod <i>Pichia</i>	PO	AP (bp)	RF (bp)	
	s14	880	310+240+170+130		s34	650	n	
	s45	880	310+240+170+130		s37	650	n	
	s46	880	310+240+170+130		s44	600	400+120+80	
	s47	880	310+240+170+130		s25	450	350+80	
	s48	880	310+240+170+130		s33	450	350+80	
	s49	880	310+240+170+130		s7	450	300+80+60	
	s56	880	310+240+170+130		O	s57	500	400+100
	s58	880	310+240+170+130			s30	650	420+130+80
	s59	880	310+240+170+130			s38	650	420+130+80
	s60	880	310+240+170+130					
	s61	880	310+240+170+130					
	s62	880	310+240+170+130					
	s63	880	310+240+170+130					



Obr. 16: Elektroforeogram štěpení DNA různých druhů kvasinek rodu *Hanseniaspora* (s39, s40, s35, s26, s29, s36) a *Saccharomyces* (s9, s24, s63). M – délkový standard 100 bp plus, MI – délkový standard 20 bp, pk – pozitivní kontrola (750 bp, 450 bp a 880 bp).

DNA kvasinek rodu *Hanseniaspora* byla štěpena restriční endonukleázou *HaeIII* pouze u tří vzorků. U ostatních vzorků nebylo nalezeno štěpné místo a tudíž nedošlo k naštipání DNA na specifické fragmenty.

Všechny druhy rodu *Saccharomyces* a *Kluyveromyces* ukazují po digesci stejný obraz štěpení. Tímto enzymem nelze tedy jednotlivé druhy rodu *Saccharomyces* odlišit.

Štěpení rodu *Rhodotorula* lze v našem případě rozdělit do čtyř skupin – první skupina zahrnuje DNA, která nemá specifické štěpné místo a tedy není štěpena, druhá skupina je charakteristická dvěma fragmenty délky 450 + 240 bp, další skupina poskytuje tři fragmenty 420 + 130 + 80 bp a fragmenty poslední skupiny se pohybují kolem 400 + 220 bp. V rámci druhu byla *R. glutinis* štěpena třemi různými způsoby. Buď nebylo u typových kvasinek tohoto druhu nalezeno štěpné místo nebo byly získány 2 fragmenty pohybující se kolem 400

a 220 bp a 450 + 240 bp U ostatních druhů tohoto rodu, jmenovitě *R. minuta*, *R. mucilaginosa*, *R. graminis*, *Rhodosporidium toruloides* byly délky fragmentů shodné jako u *R. glutinis*. *Sp. pararoseus* a *Sp. salmonicolor* byly štěpeny shodně na tři fragmenty.

U rodu *Pichia* byly molekulárně charakterizovány čtyři druhy, kdy každý z nich poskytuje jiný obraz restričních fragmentů.

#### 4.1.4.2 Enzym *HhaI*

Enzym *HhaI* byl zvolen jako další restriční endonukleáza. *HhaI* (*CfoI*) rozpoznává a štěpí místo 5' GCG↓C 3' DNA. Podle výsledků uvedených v tabulce 6 všechny typové kvasinky toto místo mají – DNA byla štěpena u všech vzorků. Ukázka štěpení enzymu *HhaI* je na obr. 17.

**Tab. 6:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou *HhaI*.

	PO	AP (bp)	RF (bp)		PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Hanseniaspora</i>	s28	450	170+120+80	Rod <i>Rhodotorula</i>	s1	650	300+220+100
	s35	450	170+120+80		s4	650	300+220+100
	s16	750	320+100		s5	650	300+220+100
	s17	750	320+100		s6	650	300+220+100
	s18	750	320+100		s23	650	300+220+100
	s19	750	320+100		s50	650	300+220+110
	s20	750	320+100		s51	650	300+220+110
	s21	750	320+100		s53	650	300+220+110
	s26	750	320+100		s54	650	300+220+110
	s36	750	320+100		s52	650	300+220+110
	s15	750	650+100		s55	650	300+220+110
	s40	750	320+100		s27	650	300+220+100
	s29	750	300+180+100+60		s31	650	320+300
	s39	750	280+150		s32	650	300+220+100
Rod <i>Saccharomyces</i>	s24	880	380+350+140	s2	650	300+220+100	
	s8	900	380+350+140	s3	650	300+220+100	
	s9	880	380+350+140	s42	650	300+220	
	s10	880	380+350+140	s43	650	300+220	
	s11	880	220+180+80+60	Rod <i>Pichia</i>	s34	650	280+60
	s12	880	380+350+140		s37	650	280+60
	s13	880	380+350+140		s44	600	300+260
	s14	880	380+350+140		s25	450	180+100+80
	s45	880	380+350+140		s33	450	180+100+80
	s46	880	380+350+140		s7	450	220+100+80
s47	880	380+350+140	O	s57	500	220+180	

Tab. 6: Pokračování

	PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Saccharomyces</i>	s49	880	380+350+140
	s56	880	380+350+140
	s58	880	380+350+140
	s59	880	380+350+140
	s60	880	380+350+140
	s61	880	380+350+140
	s62	880	380+350+140
	s63	880	380+350+140

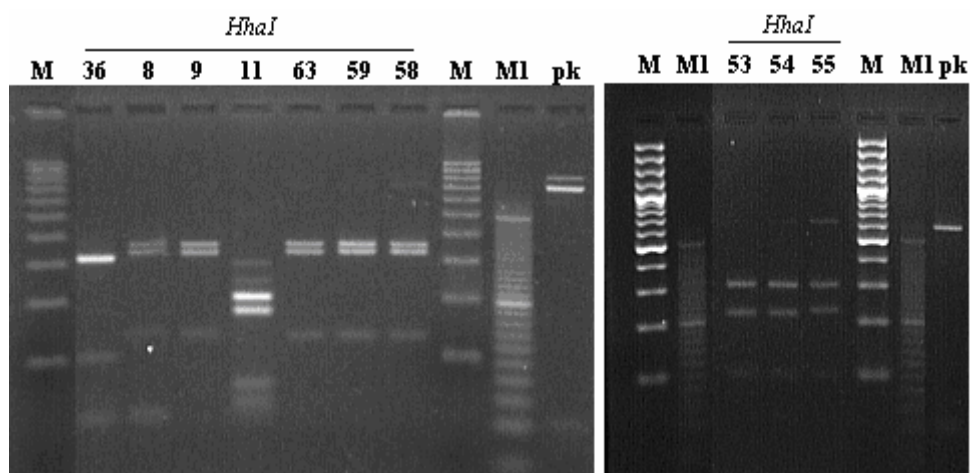
	PO	AP (bp)	RF (bp)
○	s38	650	400+220
	s30	650	300+220+100

Jednotlivé druhy rodu *Saccharomyces* nelze tímto enzymem odlišit. Délky jednotlivých fragmentů byly opět shodné. Výjimku tvoří vzorek s11 (*S. cerevisiae*, 21-4-81), u něhož byly získány odlišné délky fragmentů v porovnání se zbylými devatenácti druhy, u kterých je výsledný obraz štěpení zcela totožný. Zbylých 11 typových kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae* je štěpeno shodně.

DNA izolovaná z jádra buněk kvasinek rodu *Hanseniaspora* je v rámci druhu *H. uvarum* štěpena třemi různými způsoby – převažují fragmenty 320 + 100 bp, vzorky s25, s33 byly štěpeny na tři fragmenty délky 170 + 120 + 80 bp a vzorek s29 byl štěpen na čtyři fragmenty délky 300 + 180 + 100 + 60 bp. *H. guilliermondii* byla štěpena stejně jako *H. uvarum*. Kvasinky *H. valbyesis* a *H. vineae* lze od ostatních typových kvasinek rodu *Hanseniaspora* tímto enzymem snadno odlišit.

DNA druhů rodu *Rhodotorula* byla téměř všechna štěpena kolem 300 + 220 + 100 bp. U této skupiny se odlišuje pouze kvasinka s31 – *R. glutinis*. *Sp. pararoseus* byl štěpen shodně jako *R. glutinis*. V porovnání s předchozím enzymem lze oba použité druhy rodu *Sporidiobolus* touto restrikázou od sebe odlišit.

Restrikční obraz kvasinek rodu *Pichia* je odlišný u všech použitých druhů.



Obr. 17: Elektroforeogram ukázky štěpení enzymu *HhaI* v rámci rodů *Hanseniaspora* (s36), *Saccharomyces* (s8 – s11, s58, s59, s63) a *Rhodotorula* (s53 – s55).

#### 4.1.4.3 Enzym *Taq<sup>α</sup>I*

Enzym *Taq<sup>α</sup>I*, jako jedna z restrikčních endonukleáz použitá ke štěpení PCR produktů, štěpí DNA v místě 5' T↓CGA 3'. Délky fragmentů získaných digescí tímto enzymem jsou uvedeny v tab. 7, ukázka štěpení je na obr. 18.

Všechny typové kvasinky byly tímto enzymem štěpeny. Délky fragmentů získaných digescí tímto enzymem jsou uvedeny v tab. 7, ukázka štěpení je na obr. 18.

**Tab. 7:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *Taq<sup>α</sup>I*.

	PO	AP (bp)	RF (bp)		PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Hanseniaspora</i>	s28	450	160+140+120	Rod <i>Rhodotorula</i>	s1	650	340+220
	s35	450	160+140+120		s4	650	340+220
	s16	750	400+180+150		s5	650	340+220
	s17	750	400+180+150		s6	650	340+220
	s18	750	400+180+150		s23	650	340+220
	s19	750	400+180+150		s50	650	380+240
	s20	750	400+180+150		s51	650	380+240
	s21	750	400+180+150		s53	650	380+240
	s26	750	400+180+150		s54	650	380+240
	s36	750	400+180+150		s52	650	240+180
	s15	750	400+240		s55	650	240+180
	s40	750	300+170+140		s27	650	240+180
	s29	750	400+180+150		s31	650	240+180
	s39	750	410+340		s32	650	240+180
Rod <i>Saccharomyces</i>	s8	900	300+280+140+100+60	s2	650	340+220	
	s24	880	300+280+140+100+60	s3	650	340+220	
	s9	880	300+280+140+100+60	s42	650	240+180	
	s10	880	300+280+140+100+60	s43	650	380+240	
	s11	880	300+280+140+100+60	Rod <i>Pichia</i>	s34	650	320+200
	s12	880	300+280+140+100+60		s37	650	320+200
	s13	880	300+280+140+100+60		s44	600	250+180+160
	s14	880	300+280+140+100+60		s25	450	260+200
	s45	880	300+280+140+100+60		s33	450	200+160+50
	s46	880	300+280+140+100+60	s7	450	200+160+50	
	s47	880	300+280+140+100+60	O	s57	500	300+120
	s48	880	300+280+140+100+60		s30	650	360+220
	s49	880	300+280+140+100+60		s38	650	340+200
	s56	880	300+280+140+100+60				
s58	880	300+280+140+100+60					

**Tab. 7: Pokračování.**

	PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Sacch.</i>	s60	880	300+280+140+100+60
	s61	880	300+280+140+100+60
	s62	880	300+280+140+100+60
	s63	880	300+280+140+100+60

Podle tab. 7 lze usuzovat, že všechny typové kvasinky byly tímto enzymem štěpeny.

Kvasinky rodu *Hanseniaspora* jsou štěpeny v rámci druhu shodně – *H. uvarum* je štěpena na tři fragmenty délky 400 + 180 + 150 bp. Kvasinky *H. valbyensis* (400 + 240 bp), *H. vinae* (400 + 340 bp) a *H. guilliermondii* (300 + 170 + 140 bp) lze tímto enzymem opět odlišit.

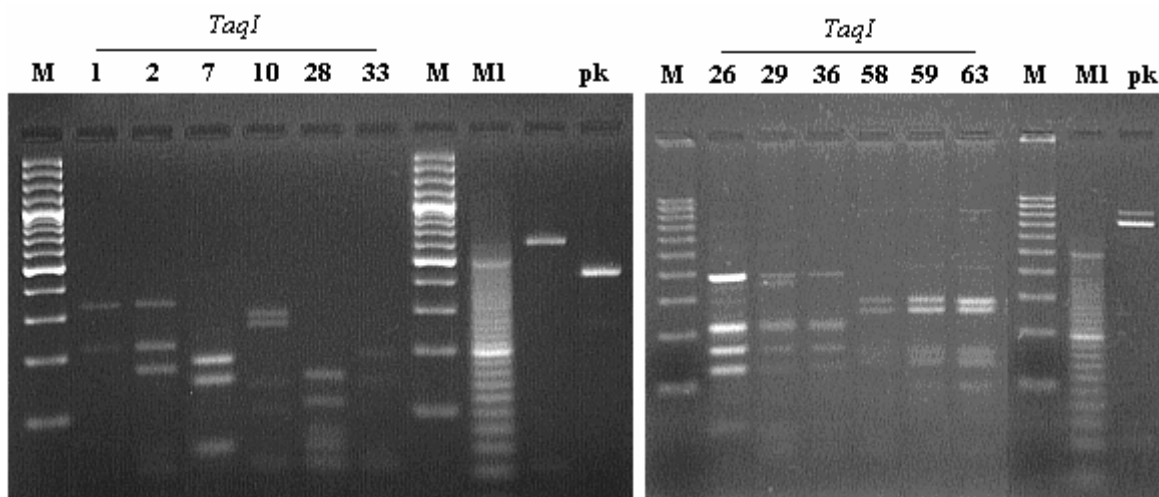
Obraz štěpení všech druhů kvasinek rodu *Saccharomyces* je zcela totožný, kvasinky tohoto rodu opět nelze enzymem *Taq*<sup>o</sup>I odlišit.

Kvasinky rodu *Pichia* jsou štěpeny na 2 – 3 fragmenty. Zajímavostí zde je, že vzorky s25 × s33 poskytují po digesci různé délky fragmentů. Jedná se o stejný druh *P. fermentans*, ale jiný kmen – 39-4-2 (s25) × 39-4-1 (s33). Lze tedy konstatovat, že použitou restriční endonukleázou by mohly být tyto kvasinky odlišeny až na úrovni kmene.

DNA většiny kvasinek rodu *Rhodotorula* je štěpena na dva fragmenty pohybující se kolem 400 + 200 bp. Druh *R. glutinis* je štěpen dvěma různými způsoby a to buď na fragmenty pohybující se kolem 340 + 220 bp a na fragmenty délky 240 + 180 bp. Ostatní druhy rodu *Rhodotorula* jsou štěpeny buď shodně jako *R. glutinis* nebo tak, že se od sebe dají odlišit.

Použitím tohoto enzymu lze od sebe odlišit druhy *Sp. pararoseus* *Sp. salmonicolor*.

Obr. 18 ukazuje štěpení některých druhů kvasinek. Jsou zde ukázány rozdíly ve štěpení v rámci rodu *Pichia* – vzorek s33 *P. fermentans*, s7 *P. membranifaciens* a ukázka zcela totožných fragmentů kvasinek rodu *Saccharomyces*. Ukázán je taktéž obraz štěpení rodu *Hanseniaspora* a *Rhodotorula*.



**Obr. 18:** Ukázka elektroforeogramu s restričními fragmenty získanými štěpením enzymem *Taq*<sup>o</sup>I. s1, s2 – *R. glutinis*, s7 – *P. membranifaciens*, s10 – *S. cerevisiae*, s33 – *P. fermentans*, s 26, s28, s29, s36 – *H. uvarum*, s58 – *S. aceti*, s59 – *S. oviformis*, s63 – *S. bayanus*.

#### 4.1.4.4 Enzym *HinfI*

Enzym *HinfI* rozpoznává a štěpí místo 5' G↓ATC 3' DNA. Štěpné místo bylo nalezeno u všech použitých typových kvasinek. Fragменты získané štěpením PCR produktu jsou pro přehlednost uvedeny v tab. 8. Ukázka štěpení tohoto enzymu je na obr. 19.

**Tab. 8:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HinfI*.

	PO	AP (bp)	RF (bp)		PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Hanseniaspora</i>	s28	450	250+200	Rod <i>Rhodotorula</i>	s1	650	220+120
	s35	450	250+200		s4	650	220+120+80
	s16	750	350+200+160+70		s5	650	220+120
	s17	750	350+200+160+70		s6	650	220+120
	s18	750	350+200+160+70		s23	650	220+120+80
	s19	750	350+200+160+70		s50	650	280+140+100
	s20	750	350+200+160+70		s51	650	240+140+100
	s21	750	350+200+160+70		s53	650	240+140+100
	s26	750	350+200+160+70		s54	650	240+140+100
	s36	750	350+200+160+70		s41	650	350
	s15	750	240+220+180+120		s52	650	260+240
	s40	750	350+200+160+70		s55	650	380+240
	s29	750	350+200+160+70		s27	650	150+120+80+60
	s39	750	380		s31	650	280+240+100
Rod <i>Saccharomyces</i>	s8	900	350+120	s32	650	250+220+70	
	s24	880	350+120	s2	650	220+120+80	
	s9	880	350+120	s3	650	220+120+80	
	s10	880	350+120	s42	650	350+220	
	s11	880	350+120	s43	650	350+220+120+100	
	s12	880	350+120	Rod <i>Pichia</i>	s34	650	310+200+140
	s13	880	350+120		s37	650	320+180+120
	s14	880	350+120		s44	600	310+290
	s45	880	350+120		s25	450	250+200
	s46	880	350+120		s33	450	250+200
	s47	880	350+120	s7	450	250+200	
	s48	880	350+120	O	s57	500	220+180+150
	s49	880	350+120		s30	650	300+180+220+120+80
	s56	880	350+120		s38	650	280+240+100
	s58	880	350+120				
	s59	880	350+120				
	s60	880	350+120				
	s61	880	350+120				
	s62	880	350+120				
	s63	880	350+120				



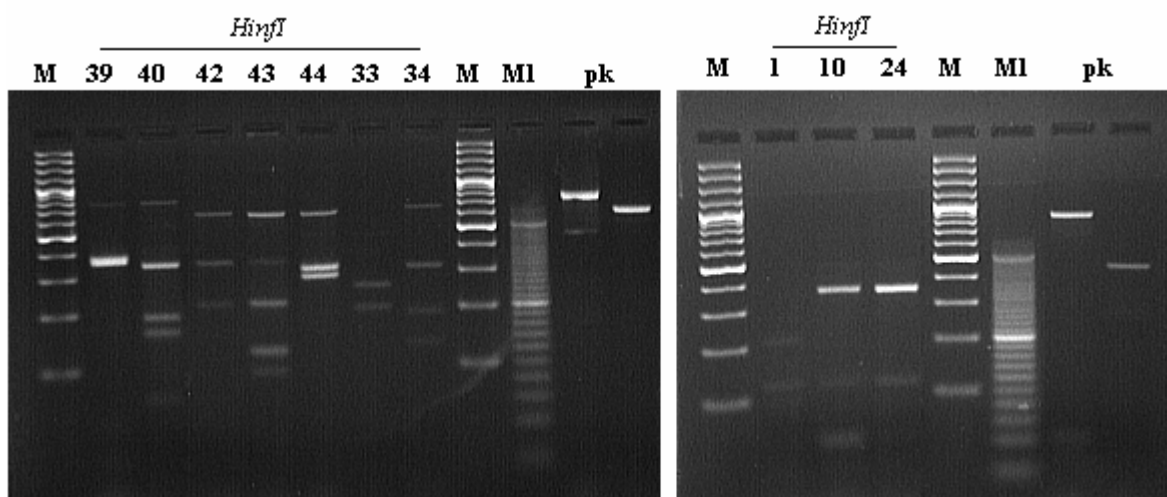
Typové kvasinky rodu *Hanseniaspora* štěpené enzymem *Hin*I poskytují 3 skupiny délek fragmentů – převažující 350 + 200 + 160 + 70 bp, dále 250 + 200 bp pro druh *H. uvarum*. *H. valbyensis* je štěpena na 240 + 220 + 180 + 120 bp a *H. vineae* je štěpena na jeden fragment délky 380 bp.

Kvasinky rodu *Saccharomyces* poskytují opět stejný obraz štěpení. Délky restričních fragmentů se pohybují kolem 400 + 130 bp. Vybrané typové kvasinky tohoto rodu jsou opět enzymem *Hin*I neodlišitelné.

DNA různých druhů kvasinek rodu *Rhodotorula* byla restriktázou *Hin*I naštěpena tak, že ve výsledku lze říci, že tento enzym dokáže od sebe odlišit jednotlivé námi použité druhy tohoto rodu.

U rodu *Pichia* nebylo možné použitím této restriční endonukleázy odlišit *P. membranifaciens* od *P. fermentans*.

Na obrázku 19 můžeme vidět rozdíly ve štěpení v rámci jednoho rodu. Jako příklad je zde uvedena kvasinka *P. fermentans* (s33) × *P. guilliermondii* (s44) × *P. subpelliculosa* (s34), dále rod *Rhodotorula*, druhově kvasinky *R. minuta* (s42) × *R. graminis* (s43), která má navíc dva fragmenty délky 120 a 100 bp a *R. glutinis* (s1). Z rodu *Saccharomyces* je zde uveden příklad druhu *S. cerevisiae* (s10) a *S. mangini* (s24).



**Obr. 19:** Ukázka štěpení DNA enzymem *Hin*I pro vzorky s39 – *H. vineae*, s40 – *H. guilliermondii*, s42 – *R. minuta*, s43 – *R. graminis*, s44 – *P. guilliermondii*, s33 – *P. fermentans*, s34 – *P. subpelliculosa*, s1 – *R. glutinis*, s10 – *S. cerevisiae*, s24 – *S. mangini*.

#### 4.1.4.5 Enzym *Hpa*II

Enzym *Hpa*II štěpí DNA v místě 5' C↓CGG 3' DNA. Délky restričních fragmentů získané po digesci tímto enzymem jsou uvedeny v tab. 9. Na obr. 20 je ukázka štěpení restriční endonukleázy *Hpa*II.

**Tab. 9:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou *HpaII*.

	PO	AP (bp)	RF (bp)		PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Hanseniaspora</i>	s28	450	n	Rod <i>Rhodotorula</i>	s1	650	n
	s35	450	n		s4	650	500+120
	s16	750	n		s5	650	n
	s17	750	n		s6	650	300
	s18	750	n		s23	650	n
	s19	750	n		s50	650	500+120
	s20	750	n		s51	650	n
	s21	750	n		s53	650	n
	s26	750	n		s54	650	n
	s36	750	n		s41	650	n
	s15	750	n		s52	650	n
	s40	750	n		s55	650	500+120
	s29	750	n		s27	650	500+120
	s39	750	n		s31	650	500+120
	Rod <i>Saccharomyces</i>	s8	900		700+120	s32	650
s24		880	700+120	s2	650	550	
s9		880	700+120	s3	650	550	
s10		880	700+120	s42	650	550	
s11		880	700+120	s43	650	n	
s12		880	700+120	Rod <i>Pichia</i>	s34	650	n
s13		880	700+120		s37	650	n
s14		880	700+120		s44	600	380+160
s45		880	700+120		s25	450	240+150
s46		880	700+120		s33	450	240+150
s47		880	700+120	s7	450	240+150	
s48		880	700+120	O	s57	500	280
s49		880	700+120		s30	650	300
s56		880	700+120		s38	650	300
s58		880	700+120				
s59		880	700+120				
s60		880	700+120				
s61		880	700+120				
s62		880	700+120				
s63		880	700+120				

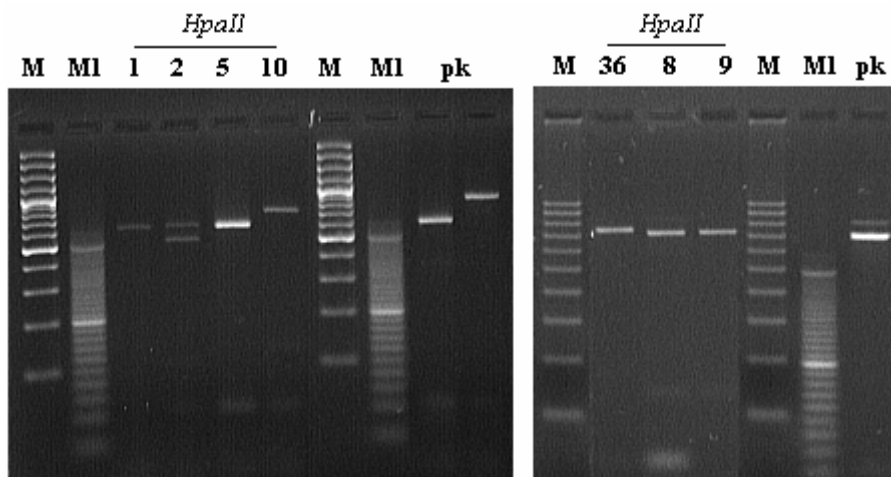
Z výsledků v tabulce 9 je zřejmé, že všechny druhy kvasinek rodu *Hanseniaspora* nemají štěpné místo – ani u jednoho vzorku nedošlo ke štěpení PCR produktu.

Digescí enzymem *HpaII* PCR produktu všech druhů kvasinek rodu *Saccharomyces* byl opět získán totožný obraz štěpení u všech těchto druhů. Lze tedy říci, že restriční endonukleázou *HpaII* nelze kvasinky rodu *Saccharomyces* odlišit.

DNA kvasinek rodu *Rhodotorula* byla buď neštěpena nebo štěpena na dva fragmenty jejichž velikost se pohybuje kolem 500 a 120 bp.

U rodu *Pichia* došlo k naštěpení PCR produktu o velikosti 450 bp na dva fragmenty velikosti 240 a 150 bp.

Obr. 20 ukazuje výsledek štěpení enzymu *HpaII*. Jsou zde vidět rozdíly ve štěpení v rámci druhu – vzorek s1 a s5 × s2 (*R. glutinis*), dále stejné štěpení vzorků s8 (*Kluyveromyces lactis*), s9, s10 (*S. cerevisiae*) a s36 (*H. uvarum*), u kterého nebylo nalezeno štěpné místo.



Obr. 20: Elektroforeogram ukázky štěpení enzymu *HpaII*.

#### 4.1.4.6 Enzym *AluI*

Restrikční endonukleáza *AluI* vyhledává a štěpí DNA v místě 5' AG↓CT 3'. Téměř všechny typové kvasinky byly tímto enzymem štěpeny na 2 – 3 fragmenty. Výsledek štěpení pro jednotlivé typové kvasinky je uveden v tab. 10, názorná ukázka štěpení je na obr. 21.

Tab. 10: Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *AluI*.

	PO	AP (bp)	RF (bp)		PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Hanseniaspora</i>	s28	450	400+60	Rod <i>Rhodotorula</i>	s1	650	300+110+90
	s35	450	400+60		s4	650	300+110+90
	s16	750	550+180		s5	650	300+110+90
	s17	750	550+180		s6	650	300+110+90
	s18	750	550+180		s23	650	300+110+90
	s19	750	550+180		s50	650	300+110+90
	s20	750	550+180		s51	650	300+110+90
	s21	750	550+180		s53	650	300+110+90
	s26	750	550+180		s54	650	300+110+90
	s36	750	550+180		s52	650	450+120
	s15	750	300+280+190		s55	650	450+120
	s40	750	500+150		s27	650	300+110+90

**Tab. 10:** Pokračování. *H.* – rod *Hanseniaspora*.

	PO	AP (bp)	RF (bp)		PO	AP (bp)	RF (bp)	
Rod <i>Saccharomyces</i>	<i>H.</i>	s39	750	700	Rod <i>Rhodot.</i>	s32	650	200+120+90
	s8	900	800+80	s2		650	300+110+90	
	s24	880	800+80	s3		650	400+300	
	s9	880	800+80	s42		650	400+120+90	
	s10	880	800+80	s43		650	300+110+90	
	s11	880	800+80	Rod <i>Pichia</i>		s34	650	n
	s12	880	800+80		s37	650	n	
	s13	880	800+80		s44	600	n	
	s14	880	800+80		s25	450	290	
	s45	880	800+80		s33	450	290	
	s46	880	800+80		s7	450	320+90+60	
	s47	880	800+80	O	s57	500	350	
	s48	880	800+80		s30	650	300+110+90	
	s49	880	800+80		s38	650	300+110+90	
	s56	880	800+80					
	s58	880	800+80					
	s59	880	800+80					
	s60	880	800+80					
	s61	880	800+80					
	s62	880	800+80					
s63	880	800+80						

Z tabulky výše je zřejmé, že téměř všechny typové kvasinky byly tímto enzymem štěpeny. Štěpné místo nebylo nalezeno pouze u tří vzorků kvasinek rodu *Pichia* (s34, s37 – *P. subpelliculosa*, s44 – *P. guilliermondii*).

U rodu *Hanseniaspora* je obraz štěpení téměř totožný – velikost fragmentů se pohybuje kolem 550 + 180 bp. Výjimku tvoří vzorky s28, s35 (*H. uvarum*), u kterých je velikost restričních fragmentů 400 + 60 bp a *H. valbyensis* (s15) se třemi restričními fragmenty délky 300 + 280 + 190 bp.

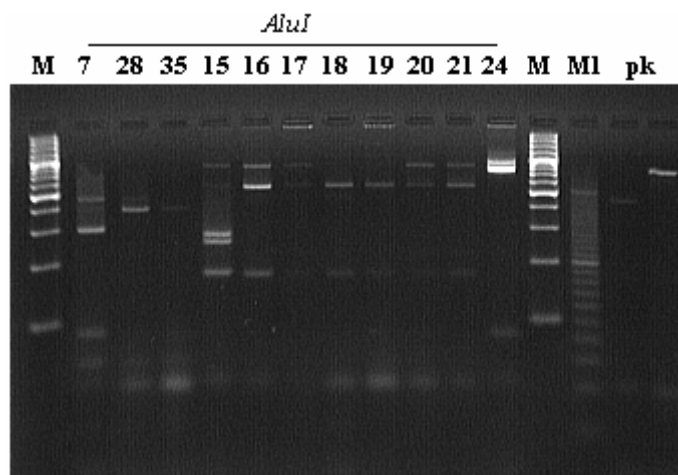
Všechny typové kvasinky spadající do rodu *Saccharomyces* byly opět štěpeny zcela totožně. Enzymem *AluI* tedy opět nelze tyto kvasinky od sebe odlišit.

U typových kvasinek rodu *Rhodotorula* byly po štěpení amplikonu ve většině případech získány 3 fragmenty. PCR produkt druhu *R. glutinis* byl štěpen třemi možnými způsoby. V převaze byly získány fragmenty délky 300 + 110 + 90 bp. V rámci druhu se odlišnost štěpení projevuje u vzorku s31, u kterého jsou délky fragmentů 200 + 120 + 90 bp a u typových kvasinek s52, s55 jsou délky fragmentů 450 + 120 bp. Ze zbylých druhů lze tímto enzymem odlišit pouze *R. mucilaginosa* (s32) a *R. minuta* (s42), ostatní druhy jsou štěpeny totožně jako *R. glutinis*.

Oba druhy rodu *Sporidiobolus* nelze enzymem odlišit od druhu *R. glutinis* ani od sebe navzájem.

*P. subpelliculosa* byla štěpena shodně jako *P. guilliermondii*. Na druhou stranu však byly od sebe odlišitelné *P. membranifaciens* a *P. fermentans*.

Výsledky štěpení jsou shrnuty v tab. 10. Obrázek 21 ukazuje štěpení některých typových kvasinek. Je zde ukázán rozdíl ve štěpení *H. uvarum* (s16 – s21) × *H. valbyensis* (s15), dále štěpení rodu *Saccharomyces* (s24 – *S. mangini*) a *P. membranifaciens* (s7).



**Obr. 21:** Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *AluI*.

#### 4.1.4.7 Enzym *MseI*

Enzym *MseI* byl použitý jako poslední restrikční endonukleáza zejména za účelem odlišení kvasinek rodu *Saccharomyces*. Enzym *MseI* vyhledává a štěpí DNA v místě 5' T↓TAA 3'. Výsledné délky restrikčních fragmentů jsou uvedeny v tab. 11, obraz štěpení je ukázán na obr. 22.

**Tab. 11:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *MseI*.

	PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Hanseniaspora</i>	s28	450	350+300+120
	s35	450	320+280
	s16	750	300+140+100
	s17	750	300+140+100
	s18	750	300+140+100
	s19	750	300+140+100
	s20	750	300+140+100
	s21	750	300+140+100
	s26	750	250+120+90+80+50
	s36	750	250+120+90+80+50
	s15	750	250+160+80+50
	s40	750	250+120
Rod <i>Rhodotorula</i>	s1	650	450
	s4	650	480+90+60
	s5	650	400+70+50
	s6	650	400+70+50
	s23	650	400+70+50
	s50	650	450
	s51	650	450
	s53	650	450
	s54	650	450
	s52	650	200+160+110
	s55	650	200+160+110
s27	650	450	

Tab. 11: Pokračování

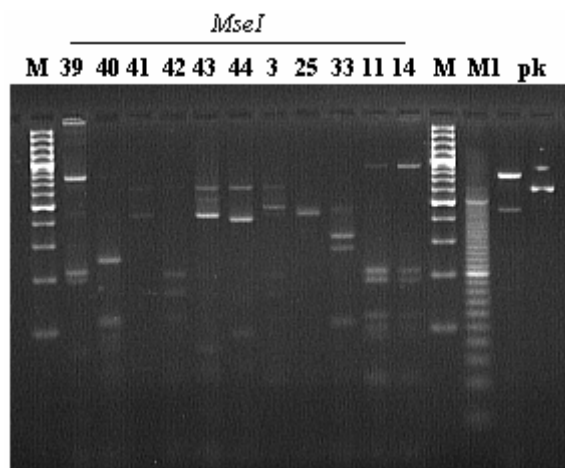
	PO	AP (bp)	RF (bp)		PO	AP (bp)	RF (bp)
Rod <i>Saccharomyces</i>	H. s39	750	220+200+70	Rod <i>Rhodot.</i>	s31	650	200+160+110
	s8	900	220+180+120+100+90		s32	650	200+160+110
	s24	880	240+200+140+100		s2	650	200+160+110
	s9	880	220+180+120+100+90		s3	650	450
	s10	880	220+180+120+100+90		s42	650	200+160+110
	s11	880	220+180+120+100+90		s43	650	450
	s12	880	220+180+120+100+90	Rod <i>Pichia</i>	s34	650	240+140+120
	s13	880	220+180+120+100+90		s37	650	240+140+120
	s14	880	220+180+120+100+90		s44	600	400+100
	s45	880	220+180+120+100+90		s25	450	n
	s46	880	220+180+120+100+90		s33	450	n
	s47	880	220+180+120+100+90		s7	450	180+100+50
	s48	880	220+180+120+100+90	O	s57	500	n
	s49	880	220+180+120+100+90		s30	650	480+90+60
	s56	880	220+180+120+100+90		s38	650	480+90+60
	s58	880	220+180+120+100+90				
	s59	880	220+180+120+100+90				
	s60	880	220+180+120+100+90				
	s61	880	220+180+120+100+90				
	s62	880	220+180+120+100+90				
s63	880	220+180+120+100+90					

Štěpením DNA enzymem *MseI* lze od sebe odlišit jednotlivé druhy rodu *Hanseniaspora*. *H. uvarum* byla touto restriktázou štěpena na tři fragmenty 300, 140, 100 bp.

Jednotlivé druhy rodu *Saccharomyces* nebylo možné opět odlišit. Stejně jako při použití předchozích šesti enzymů nedošlo k odlišení jednotlivých druhů.

Druhy spadající do rodu *Rhodotorula* taktéž nelze restriktázou odlišit. DNA je štěpena shodně jako *R. glutinis*. Navíc rod *R. glutinis* byl štěpen čtyřmi způsoby. *Sp. pararoseus* a *Sp. salmonicolor* nelze taktéž od sebe odlišit.

Všechny druhy rodu *Pichia* lze tímto enzymem bez problému odlišit.



**Obr. 22:** Elektroforeogram po digesci PCR produktu enzymem *MseI*.

#### 4.1.5 Shrnutí výsledků štěpení všech enzymů pro jednotlivé rody

V této kapitole jsou stručně shrnuty výsledky analýzy pomocí restričních endonukleáz, které jsou pro daný rod z hlediska odlišení jednotlivých druhů typových kvasinek nejlepší, a které naopak dané druhy v rámci rodu vůbec nedokáží odlišit.

##### 4.1.5.1 Kvasinky rodu *Rhodotorula*

Jako nejlepší restriční endonukleáza, která dokáže odlišit různé druhy rodu *Rhodotorula*, se ukázal enzym *HinfI*. Ze všech sedmi enzymů dokázal nejlépe odlišit všech sedm analyzovaných druhů tohoto rodu. K odlišení těchto druhů je možné ještě použít enzym *HpaII*. Enzymy *HhaI*, *Taq<sup>o</sup>I* jsou zcela nevyhovující neboť téměř všechny druhy jsou štěpeny shodně jako *R. glutinis*. Zbylé enzymy také nejsou zcela vhodné pro druhové zařazení.

##### 4.1.5.2 Kvasinky rodu *Pichia*

Použité druhy typových kvasinek rodu *Pichia* lze od sebe odlišit více enzymy. Kvasinky mohou být odlišeny enzymem *HaeIII*, *HhaI*, *Taq<sup>o</sup>I* a *MseI*. Zbytek použitých restričních endonukleáz není vhodných z hlediska stejného štěpení v rámci různých druhů rodu *Pichia*.

##### 4.1.5.3 Kvasinky rodu *Hanseniaspora*

Typové kvasinky rodu *Hanseniaspora* byly nejlépe odlišeny enzymem *Taq<sup>o</sup>I* a *AluI*. Všechny použité druhy jsou tímto enzymem štěpeny na různé délky fragmentů a tudíž je lze od sebe snadno odlišit. Naproti tomu restriční endonukleáza *HpaII* nedokázala od sebe odlišit ani jeden druh a enzym *HaeIII* není taktéž vhodný pro taxonomické zařazení kvasinek tohoto rodu. Enzymem *HhaI*, *HinfI* a *MseI* nelze odlišit druh *H. guilliermondii* od *H. uvarum*.

#### 4.1.5.4 *Kvasinky rodu Saccharomyces*

Použité typové kvasinky rodu *Saccharomyces* nebylo možné na základě druhu od sebe odlišit. Obraz štěpení pro jednotlivé analyzované druhy se po digesci všemi sedmi restričními endonukleázami zcela shodoval. Zvolená amplifikovaná oblast 5·8S-ITS tedy není vhodná pro druhové odlišení kvasinek náležících do rodu *Saccharomyces*.

#### 4.1.5.5 *Další vinné kvasinky*

Navíc byly ještě analyzovány dva druhy rodu *Sporidiobolus* a *Issatchenkia orientalis*.

Druh *Issatchenkia orientalis* není možné v našem případě srovnat s žádným jiným druhem, protože nebyly analyzovány jiné typové kvasinky v rámci rodu *Candida*.

Co se týče rodu *Sporidiobolus*, tak můžeme srovnat pouze štěpení dvou druhů – *Sp. pararoseus* a *Sp. salmonicolor*. Kvasinky lze jednoznačně odlišit pouze enzymem *Hinfl*. U ostatních enzymů byl buď obraz štěpení shodný v rámci těchto dvou druhů nebo se zcela shodoval se štěpením druhu *R. glutinis*.



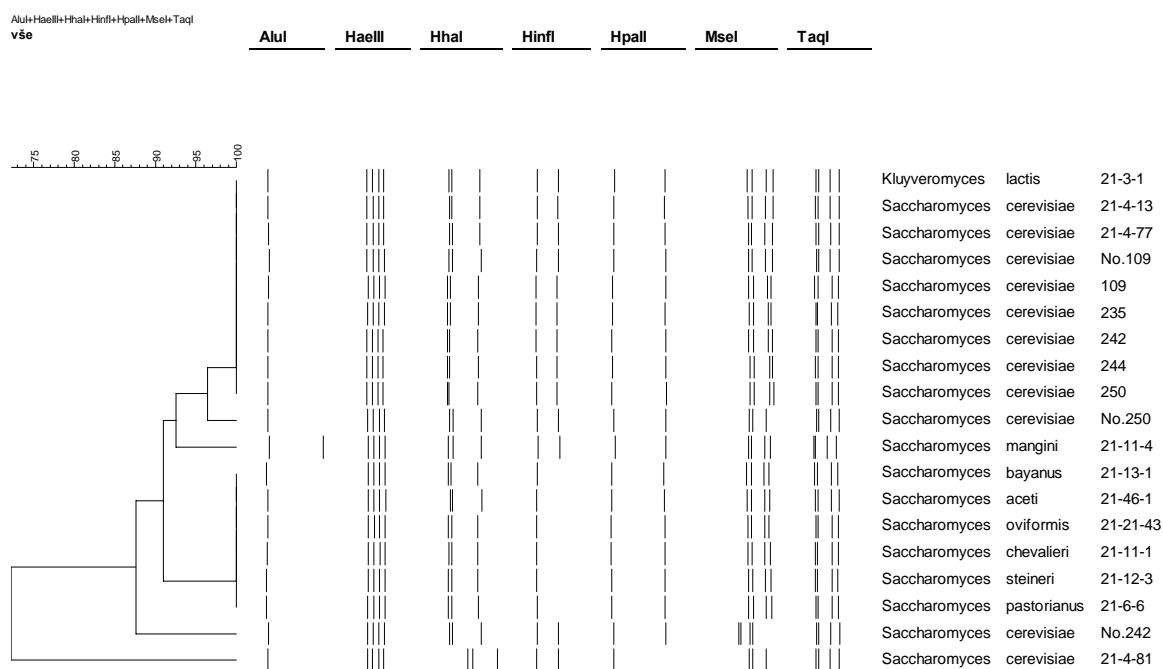
#### 4.1.6 Dendrogramy typových kvasinek rodu *Saccharomyces* a *Hanseniaspora*

Dendrogramy byly vytvářeny použitím programu BioNumerics. Program BioNumerics je charakterizován jako jednoznačně komplexní software určený k analýze všech typů biologických dat, zvláště k vyhodnocování gelů, fenotypů a sekvencí [75].

Pomocí tohoto programu byly na základě UPGMA klastrové analýzy sestaveny dendrogramy pro dané rody typových kvasinek a reálných vzorků. Cílem klastrové neboli shlukové analýzy je nalézt v celém souboru dat takové skupiny objektů, které jsou si blízké nebo podobné, ale které se liší od ostatních skupin. Jde tedy o sloučení druhů do skupin neboli shluků na základě jejich vlastností. Ve výsledku je pak každá skupina tvořena objekty s velmi podobnými vlastnostmi [76]. Jako kritérium byly zvoleny Jaccardovy koeficienty podobnosti na úrovni 1 %. Pomocí Jaccardova koeficientu podobnosti můžeme určit fylogenetický vztah mezi vzorky sledovaných druhů mikroorganismů [77].

V této práci jsou uvedeny pouze dendrogramy typových kvasinek rodu *Saccharomyces* a *Hanseniaspora*. Dendrogramy kvasinek rodu *Rhodotorula* a *Pichia* jsou řešeny v rámci jiné diplomové práce.

##### 4.1.6.1 Dendrogram rodu *Saccharomyces*



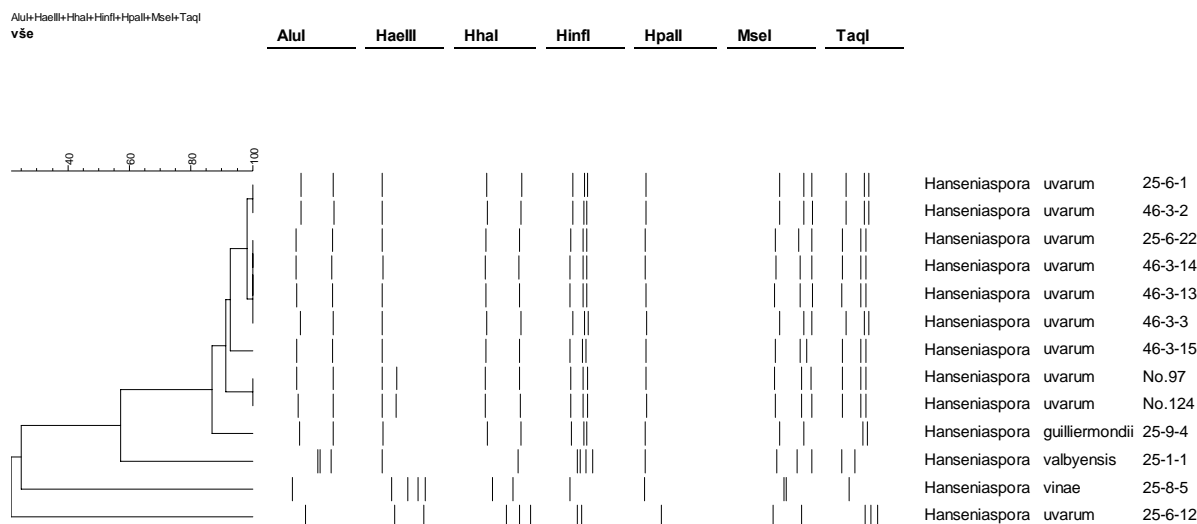
**Obr. 23:** Dendrogram genetické podobnosti typových kvasinek rodu *Saccharomyces* sestavený na základě výsledků RFLP – pro enzymy *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *Taq<sup>I</sup>* a *HinfI*.

Na základě výsledků získaných štěpením amplifikované DNA jednotlivými restrikcčními endonukleázami byly pomocí programu BioNumerics sestaveny dendrogramy, které ukazují genetickou podobnost jednotlivých kvasinek.

Na obr. 23 je znázorněn dendrogram typových kvasinek rodu *Saccharomyces*, pro jehož sestavení byl použitý právě program BioNumerics. Jako kritérium pro posouzení podobnosti byly zvoleny Jaccardovy koeficienty podobnosti. Za účelem srovnání výsledků z různých gelů

byla nastavena tolerance pozice fragmentů na gelu na hodnotu 5 %. Výsledkem jsou dvě skupiny zcela neodlišitelných kvasinek, které jsou v dendrogramu znázorněny svislou čarou na úrovni 100% podobnosti. Tyto kvasinky od sebe nelze použitím všech sedmi restričních endonukleáz druhově odlišit. *S. mangini* a *S. cerevisiae* (No.250 a No.242) jsou odlišitelné od ostatních kvasinek na úrovni zhruba 90 % podobnosti.

#### 4.1.6.2 Dendrogram rodu *Hanseniaspora*



**Obr. 24:** Dendrogram genetické podobnosti typových kvasinek rodu *Hanseniaspora* sestavený na základě výsledků RFLP – pro enzymy *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *Taq<sup>o</sup>I* a *HinfI*.

Dendrogram znázorněný na obr. 24 byl sestaven na základě výsledků restriční analýzy DNA typových kvasinek rodu *Hanseniaspora*. Jako kritérium podobnosti byly zvoleny opět Jaccardovy koeficienty podobnosti. Volbou 5% tolerance pozice fragmentů na gelu byly kvasinky rozčleněny do skupin. V rámci druhu *H. uvarum* byly kvasinky rozděleny do pěti skupin. Od sebe neodlišitelné jsou dva druhy *H. uvarum* (25-6-1 a 46-3-2), dále čtyři druhy *H. uvarum* (25-6-22, 46-3-14, 46-3-13 a 46-3-3) a dvě kvasinky s označením CCY No.97 a No.124. První dvě neodlišitelné skupiny jsou od sebe odlišitelné na úrovni 98 % podobnosti, další neodlišitelná skupina je od předchozích dvou odlišitelná na úrovni zhruba 92 %. Na základě této skutečnosti lze říci, že všechny tyto výše jmenované kmeny jsou prakticky od sebe neodlišitelné. Od těchto kvasinek se dají použitím všech sedmi restričních endonukleáz odlišit druhy *H. guilliermondii*, *H. valbyensis*, *H. vineae* a to v některých případech až na úrovni 60 – 20 % podobnosti.

## 4.2 Identifikace kvasinek izolovaných z vína

Cílem práce bylo identifikovat a taxonomicky zařadit kvasinky izolované z bílého vína v září roku 2007. Izolace probíhala v oblasti Velkých Pavlovic, u soukromého vinaře p. Šťavíka. Charakterizovány byly kvasinky, které nebyly v diplomových pracích v minulém roce zařazeny nebo byly nesprávně identifikovány. Výsledkem je monitoring kvasinek v celém kvasném procesu výroby bílého vína dané oblasti.

Kvasinky byly izolovány z listů, bobulí, půdy a vinného moštu v různých fázích kvašení v září 2007. Byly kultivovány na agarových plotnách v termostatu při 26 °C (cca 3 dny) a přečištěny zředovací metodou až na čistou kulturu. Čistá kultura byla uchována na šikmých agarech zalitých parafinovým olejem.

V říjnu roku 2008 byly kvasinky přeočkovány na agarové plotny na Petriho miskách, kultivovány při stejných podmínkách jako předchozí kultivace, z buněk byla následně vyizolována DNA, která byla namnožena pomocí polymerázové řetězové reakce, přečištěna a podrobena restriční analýze. Restriční endonukleázy byly použity stejné jako při analýze typových kvasinek. Délky jednotlivých fragmentů naštípané DNA izolované ze vzorků kvasinek byly porovnány s obrazem štěpení typových kvasinek a taxonomicky zařazeny.

Po amplifikaci DNA pomocí PCR byla zjištěna elektroforeticky délka fragmentu a podle délky fragmentu byly identifikované kvasinky rozděleny do dvou skupiny – rod *Saccharomyces* (880 bp) a *Hanseniaspora* (750 bp); *Pichia* (450 bp) a *Rhodotorula* (650 bp). V této práci byly dále identifikovány kvasinky rodu *Saccharomyces* a *Hanseniaspora*.

Některé vybrané vzorky vinných kvasinek musely být ještě přečištěny. Přečištěné vzorky kvasinek jsou v tabulce uvedeny číslem a apostrofem. Číslo značí původní nepřečištěné označení vzorku, apostrof udává počet odlišných kvasinek nalezených v nepřečištěné kultuře. S těmito vzorky bylo pracováno a jsou zaznamenány stejně jako vzorky nepřečištěné vždy ve společné tabulce. Na závěr byly přečištěné vzorky porovnány s nepřečištěnými, zda se shodují nebo ne.

### 4.2.1 Kultivace kvasinek

Po zaočkování kvasinek (uchovaných na šikmém agaru zalitých parafinovým olejem) na předem připravený sladidový agar, byly Petriho misky inkubovány v termostatu při teplotě 26 °C po dobu tří dnů. Po kultivaci byla z buněk vyizolována DNA.

### 4.2.2 Izolace DNA

DNA z jádra buňky byla vyizolována za použití komerční sady Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit. Sada byla zvolena za účelem snadné a rychlejší izolace většího množství vzorků a z hlediska vyšší čistoty izolované DNA.

Koncentrace vyizolované DNA se pohybovala v rozmezí 4 – 30 ng·μl<sup>-1</sup>. Vyizolovaná DNA byla uchována při teplotě –20 °C a následně použita k amplifikaci.

### 4.2.3 Amplifikace DNA vzorků pomocí PCR

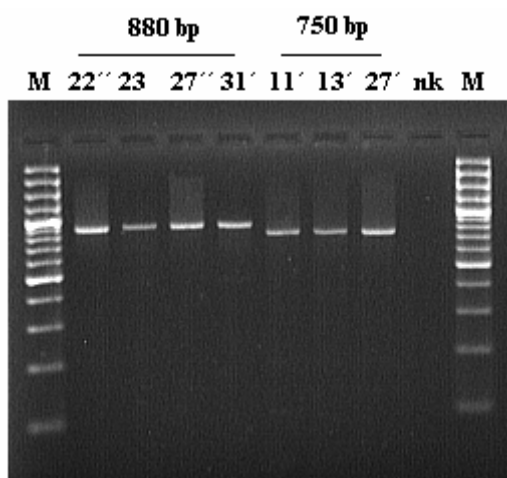
Izolovaná DNA ze vzorků kvasinek byla naamplifikována stejným způsobem jako u typových kvasinek.

Vynesením PCR produktů na gel byly zjištěny jednotlivé délky fragmentů. Amplifikací byly získány dvě rozdílné délky – 750 a 880 bp. Porovnáním těchto délek fragmentů s délkami amplifikované DNA typových kvasinek lze usuzovat, že se jedná o kvasinky rodu *Hanseniaspora* a *Saccharomyces*. U šesti vzorků je délka fragmentu 750 bp, u zbylých 24 vzorků je délka fragmentu 880 bp. Velikost amplikonu náležící příslušné identifikované kvasince izolované v různých fázích kvašení je uvedena v tab. 12.

**Tab. 12:** Velikost amplifikované oblasti 5-8S-ITS rDNA jednotlivých kvasinek izolovaných z vína a listů za použití primerů ITS1 a ITS4.

O – odběr, PO – pracovní označení, AP – velikost produktu po amplifikaci.

O	PO	AP (bp)	O	PO	AP (bp)
Listy	3	750	7. den	5"	880
	11	750		22"	880
	11'	750	9. den	25	880
	11"	880		30	880
	17'''	880	11. den	23	880
1. den	10	880		23!	880
	4"	880		32	880
	14'	880	13. den	21	880
3. den	13	750		21'	880
	13'	750		24	880
	13"	880	15. den	31	880
5. den	6	880		31'	880
	27'	750	17. den	26	880
	27"	880	19. den	28	880
7. den	1'	880		29	880



**Obr. 25:** Elektroforeogram PCR produktu získaného amplifikací 5-8S-ITS oblasti rDNA kvasinek rodu *Saccharomyces* (880 bp) a *Hanseniaspora* (750 bp) izolovaných z vína.

#### 4.2.4 Restrikční analýza vzorků kvasinek (PCR-RFLP)

Naamplifikovaná DNA byla přečištěna (přesrážena ethanolom za účelem odstranění přebytečných složek PCR směsi a získání čisté DNA) a podrobena restrikční analýze. Pro naštipání DNA na specifické fragmenty bylo použito sedm enzymů, totožných jako u RFLP typových kvasinek. Obraz štěpení, neboli délky jednotlivých fragmentů získaných štěpením DNA danou restrikční endonukleázou, byl srovnán s délkami fragmentů připravených typových kvasinek za účelem taxonomického zařazení izolovaných vinných kvasinek.

##### 4.2.4.1 Enzym *HaeIII*

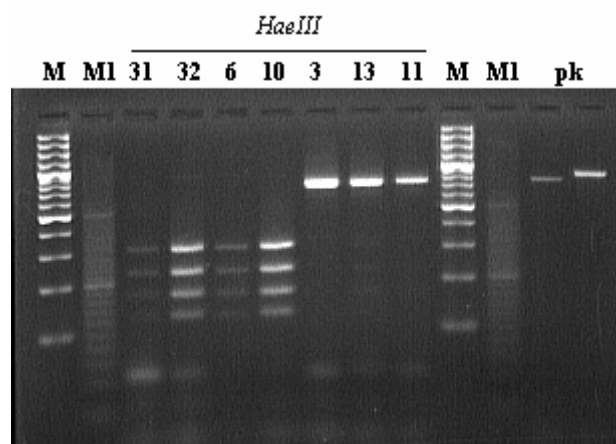
**Tab. 13:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restrikční endonukleázou *HaeIII*. O – odběr, PO – pracovní označení typové kvasinky, AP – velikost amplifikovaného produktu v bp, RF – velikost restrikčního fragmentu v bp.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
Listy	3	750	n
	11	750	n
	11'	750	n
	11"	880	310+240+180+150
	17'''	880	310+240+180+150
1. den	10	880	310+240+180+150
	4"	880	310+240+180+150
	14'	880	310+240+180+150
3. den	13	750	n
	13'	750	n
	13"	880	310+240+180+150
5. den	6	880	310+240+180+150
	27'	750	n
	27"	880	310+240+180+150
7. den	1'	880	310+240+180+150

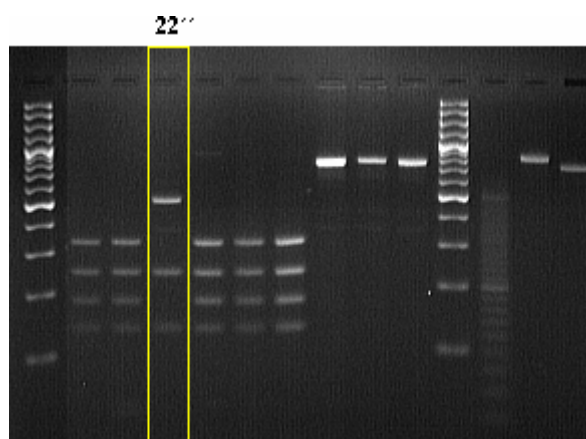
O	PO	AP (bp)	RF (bp)
7. den	5"	880	310+240+180+150
	22"	880	500+240+150
9. den	25	880	310+240+180+150
	30	880	310+240+180+150
11. den	23	880	310+240+180+150
	23!	880	310+240+180+150
	32	880	310+240+180+150
13. den	21	880	310+240+180+150
	21'	880	310+240+180+150
	24	880	310+240+180+150
15. den	31	880	310+240+180+150
	31'	880	310+240+180+150
17. den	26	880	310+240+180+150
19. den	28	880	310+240+180+150
	29	880	310+240+180+150

Enzym *HaeIII* nenašel štěpné místo u DNA délky 750 bp a tudíž nedošlo ke štěpení. PCR produkt o délce 880 bp byl téměř všechen štěpen na čtyři fragmenty délky 310 + 240 + 180 + 150 bp. Výjimku tvoří vzorek 22", který byl štěpen restrikční endonukleázou *HaeIII* na tři fragmenty délky 500 + 240 + 150 bp (v tab. 13 zvýrazněn žlutě). Nelze však říci, o jaký druh kvasinky se jedná, protože štěpení nemůžeme porovnat s délkami fragmentů typových kvasinek rodu *Saccharomyces*.

Délky jednotlivých fragmentů jsou uvedeny v tab. 13. Na obr. 26 je ukázka štěpení enzymu *HaeIII* u PCR produktu délky 880 bp a 750 bp. Odlišnost štěpení vzorku kvasinky 22" je ukázána na obr. 27.



**Obr. 26:** Elektroforeogram s ukázkou štěpení PCR fragmentů délky 750 a 880 bp enzymem *HaeIII*.  
 Vzorky 31, 32, 6, 10 – 880 bp, vzorky 3, 13, 11 – 750 bp. M – délkový standard 100 bp plus,  
 M1 – délkový standard 20 bp, pk – pozitivní kontrola.



**Obr. 27:** Ukázka štěpení vzorku 22''. Odlišné štěpení ve srovnání se štěpením zbylých PCR produktů  
 délky 880 bp.

#### 4.2.4.2 Enzym *HhaI*

**Tab. 14:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu  
 restrikční endonukleázou *HhaI*.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
Listy	3	750	320+110+60
	11	750	320+110+60
	11'	750	320+110+60
	11''	880	380+350+140
	17'''	880	380+350+140
1. den	10	880	380+350+140
	4''	880	380+350+140
	14'	880	380+350+140
7. den	5''	880	380+350+140
	22''	880	380+350+140
9. den	25	880	380+350+140
	30	880	380+350+140
11. den	23	880	380+350+140
	23!	880	380+350+140
13. den	32	880	380+350+140
	21	880	380+350+140

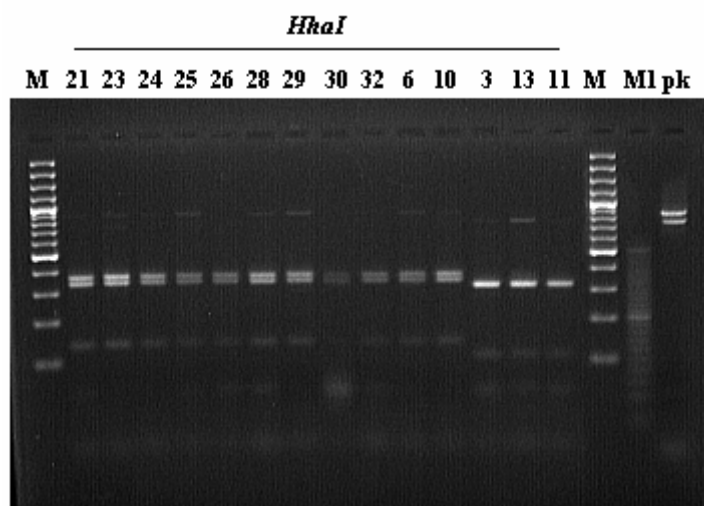
**Tab. 14:** Pokračování.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
3. den	13	750	320+110+60
	13'	750	320+110+60
	13"	880	380+350+140
5. den	6	880	380+350+140
	27'	750	320+110+60
	27"	880	380+350+140
7. den	1'	880	380+350+140

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
13. den	21'	880	380+350+140
	24	880	380+350+140
15. den	31	880	380+350+140
	31'	880	380+350+140
17. den	26	880	380+350+140
19. den	28	880	380+350+140
	29	880	380+350+140

Výsledky štěpení jsou shrnuty v tabulce 14. Obr. 28 ukazuje výsledný obraz restričních fragmentů získaných digescí PCR produktu enzymem *HhaI*.

Štěpením PCR produktu 750 bp enzymem *HhaI* byly získány u všech vzorků stejné délky fragmentů – 320 + 110 + 60 bp. Amplifikované produkty délky 880 bp byly všechny štěpeny shodně na tři fragmenty délky 380 + 350 + 140 bp.



**Obr. 28:** Ukázka štěpení PCR produktů velikosti 750 a 880 bp enzymem *HhaI*.

#### 4.2.4.3 Enzym *Taq<sup>α</sup>I*

**Tab. 15:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou *Taq<sup>α</sup>I*.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
Listy	3	750	400+180+140+60
	11	750	400+180+140+60
	11'	750	400+180+140+60
	11"	880	300+280+140+100+60

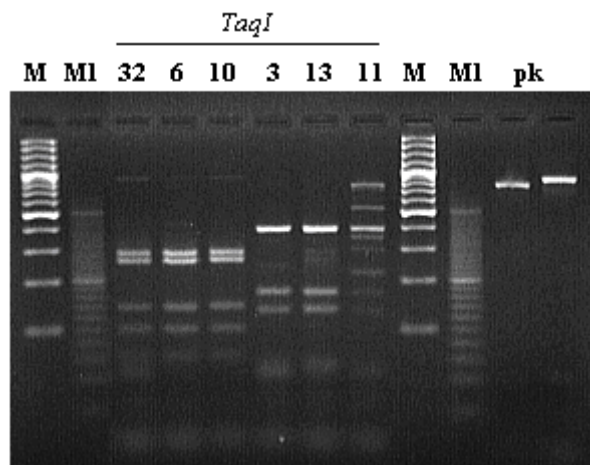
O	PO	AP (bp)	RF (bp)
7. den	5"	880	300+280+140+100+60
	22"	880	300+280+140+100+60
9. den	25	880	300+280+140+100+60
	30	880	300+280+140+100+60

**Tab. 15:** Pokračování.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)	O	PO	AP (bp)	RF (bp)
Listy	17'''	880	300+280+140+100+60		23	880	300+280+140+100+60
1. den	10	880	300+280+140+100+60	11. den	23'	880	300+280+140+100+60
	4''	880	300+280+140+100+60		32	880	300+280+140+100+60
	14'	880	300+280+140+100+60			21	880
3. den	13	750	400+180+140+60	13. den	21'	880	300+280+140+100+60
	13'	750	400+180+140+60		24	880	300+280+140+100+60
	13''	880	300+280+140+100+60			31	880
5. den	6	880	300+280+140+100+60	15. den	31'	880	300+280+140+100+60
	27'	750	400+180+140+60		17. den	26	880
	27''	880	300+280+140+100+60	19. den	28	880	300+280+140+100+60
7. den	1'	880	300+280+140+100+60		29	880	300+280+140+100+60

DNA kvasinek štěpená restriční endonuklázou *Taq*<sup>α</sup>I byla štěpena jednotně v závislosti na velikosti fragmentu amplifikované DNA. PCR produkt o délce 750 bp byl štěpen na 4 fragmenty 400 + 180 + 140 + 60 bp, amplikon 880 bp byl štěpen na 5 fragmentů 300 + 280 + 140 + 100 + 60 bp.

Výsledky štěpení jsou uvedeny v tabulce 15. Na obr. 29 je ukázka elektroforeogramu s fragmenty získanými štěpením PCR produktu 750 bp a 880 bp.



**Obr. 29:** Ukázka štěpení DNA enzymem *Taq*I. Vzorky 32, 6, 10 – výsledek štěpení PCR produktu délky 880 bp; vzorky 3, 13, 11 – výsledek štěpení PCR produktu délky 750 bp.



#### 4.2.4.4 Enzym *HinfI*

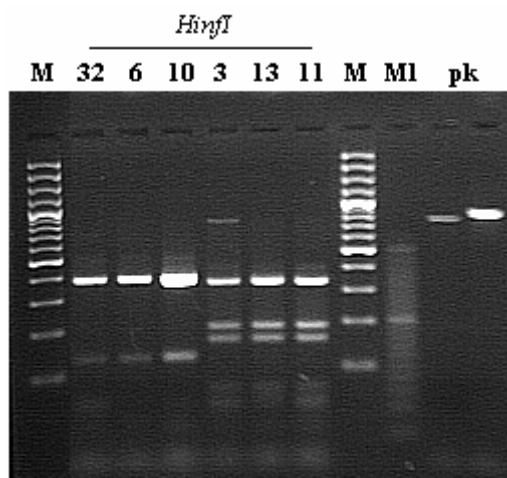
**Tab. 16:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou *HinfI*.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
Listy	3	750	340+200+160+70
	11	750	340+200+160+70
	11'	750	340+200+160+70
	11"	880	350+120
	17'''	880	350+120
1. den	10	880	350+120
	4"	880	350+120
	14'	880	350+120
3. den	13	750	340+200+160+70
	13'	750	340+200+160+70
	13"	880	350+120
5. den	6	880	350+120
	27'	750	340+200+160+70
	27"	880	350+120
7. den	1'	880	350+120

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
7. den	5"	880	350+120
	22"	880	350+120
9. den	25	880	350+120
	30	880	350+120
11. den	23	880	350+120
	23!	880	350+120
	32	880	350+120
13. den	21	880	350+120
	21'	880	350+120
15. den	24	880	350+120
	31	880	350+120
17. den	31'	880	350+120
	26	880	350+120
19. den	28	880	350+120
	29	880	350+120

Další restriční endonukleázou byla DNA délky 750 bp štěpena na 4 fragmenty (340 + 200 + 160 + 70 bp) a to opět jednotně u všech amplifikovaných fragmentů této délky. PCR produkty 880 bp byly štěpeny na 2 fragmenty (350 + 120 bp) u všech vzorků zcela shodně.

Výsledky jsou uvedeny v tab. 16. Na obr. 30 je názorná ukázka štěpení tohoto enzymu.



**Obr. 30:** Ukázka štěpení PCR produktů velikosti 880 bp (32, 6, 10) a 750 bp (3, 13, 11) enzymem *HinfI*.

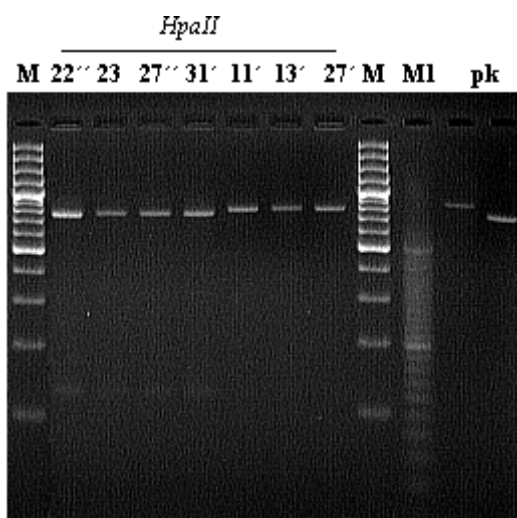
#### 4.2.4.5 Enzym *HpaII*

**Tab. 17:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou *HpaII*.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
Listy	3	750	n
	11	750	n
	11'	750	n
	11"	880	750+120
	17'''	880	750+120
1. den	10	880	750+120
	4"	880	750+120
	14'	880	750+120
3. den	13	750	n
	13'	750	n
	13"	880	750+120
5. den	6	880	750+120
	27'	750	n
	27"	880	750+120
7. den	1'	880	750+120

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
7. den	5"	880	750+120
	22"	880	750+120
9. den	25	880	750+120
	30	880	750+120
11. den	23	880	750+120
	23!	880	750+120
	32	880	750+120
13. den	21	880	750+120
	21'	880	750+120
	24	880	750+120
15. den	31	880	750+120
	31'	880	750+120
17. den	26	880	750+120
19. den	28	880	750+120
	29	880	750+120

Enzym *HpaII* nenašel štěpné místo u PCR produktů délky 750 bp a tudíž nedošlo k naštípání DNA na specifické fragmenty. Produkty délky 880 bp byly štěpeny na 2 fragmenty délky 750 + 120 bp. Výsledky jsou uvedeny souhrnně v tabulce 17, ukázka štěpení PCR produktů délky 880 bp (vzorky 22", 23, 27", 31') a 750 bp (vzorky 11', 13', 27') je na obrázku 31.



**Obr. 31:** Ukázka štěpení PCR produktu restriční endonukleázou *HpaII*.

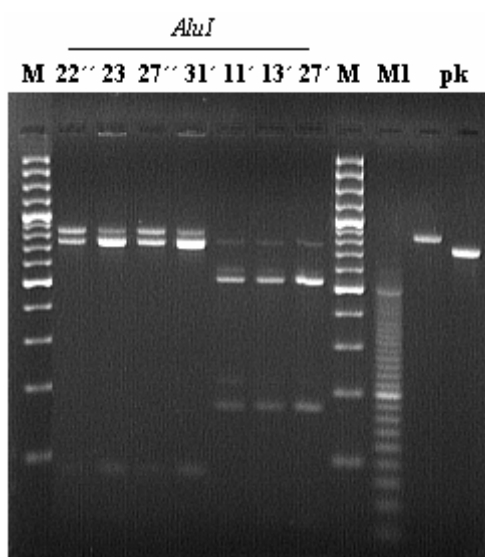
#### 4.2.4.6 Enzym *AluI*

**Tab. 18:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů získaných štěpením PCR produktu restriční endonukleázou *AluI*.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
Listy	3	750	550+180
	11	750	550+180
	11'	750	550+180
	11"	880	800+80
	17'''	880	800+80
1. den	10	880	800+80
	4"	880	800+80
	14'	880	800+80
3. den	13	750	550+180
	13'	750	550+180
	13"	880	800+80
5. den	6	880	800+80
	27'	750	550+180
	27"	880	800+80
7. den	1'	880	800+80

O	PO	AP (bp)	RF (bp)
7. den	5"	880	800+80
	22"	880	800+80
9. den	25	880	800+80
	30	880	800+80
11. den	23	880	800+80
	23!	880	800+80
	32	880	800+80
13. den	21	880	800+80
	21'	880	800+80
	24	880	800+80
15. den	31	880	800+80
	31'	880	800+80
17. den	26	880	800+80
19. den	28	880	800+80
	29	880	800+80

Po digesci amplikonu velikosti 750 a 880 bp s restriční endonukleázou *AluI* byly získány dva fragmenty – 550 + 180 bp pro amplikon délky 750 bp a 800 + 80 bp u PCR produktů délky 880 bp. Výsledky štěpení pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tab. 18, ukázka štěpení je na obrázku 32.



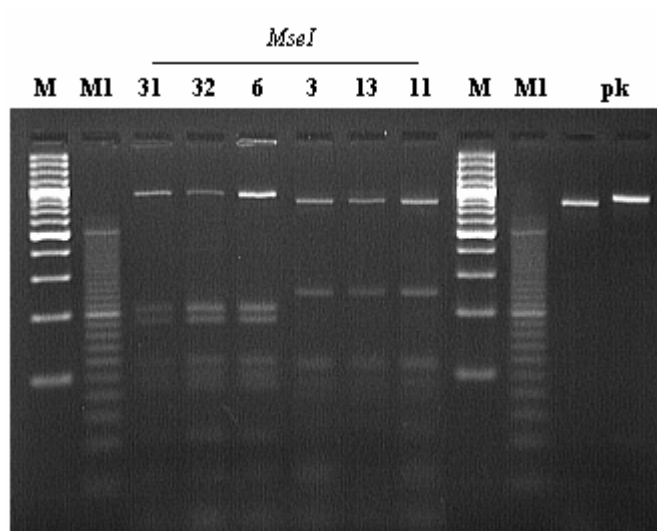
**Obr. 32:** Elektroforeogram ukázky štěpení enzymu *AluI*.

#### 4.2.4.7 Enzym *MseI*

**Tab. 19:** Souhrnná tabulka velikosti výsledných fragmentů DNA získaných štěpením PCR produktu restrikcí endonukleázou *MseI*.

O	PO	AP (bp)	RF (bp)	O	PO	AP (bp)	RF (bp)
Listy	3	750	240+120+90	7. den	5"	880	210+180+120+100 +80+50+20
	11	750	240+120+90		22"	880	210+180+120+100 +80+50+20
	11'	750	210+180+120+100 +80+50+20	9. den	25	880	210+180+120+100 +80+50+20
	11"	880	210+180+120+100 +80+50+20		30	880	210+180+120+100 +80+50+20
		17'''	880	210+180+120+100 +80+50+20	11. den	23	880
1. den	10	880	210+180+120+100 +80+50+20	23!		880	210+180+120+100 +80+50+20
	4"	880	210+180+120+100 +80+50+20	32		880	210+180+120+100 +80+50+20
	14'	880	210+180+120+100 +80+50+20	13. den	21	880	210+180+120+100 +80+50+20
3. den	13	750	240+120+90		21'	880	210+180+120+100 +80+50+20
	13'	750	240+120+90	24	880	210+180+120+100 +80+50+20	
	13"	880	210+180+120+100 +80+50+20	15. den	31	880	210+180+120+100 +80+50+20
5. den	6	880	210+180+120+100 +80+50+20		31'	880	210+180+120+100 +80+50+20
	27'	750	240+120+90	17. den	26	880	210+180+120+100 +80+50+20
	27"	880	210+180+120+100 +80+50+20	19. den	28	880	210+180+120+100 +80+50+20
7. den	1'	880	210+180+120+100 +80+50+20		29	880	210+180+120+100 +80+50+20

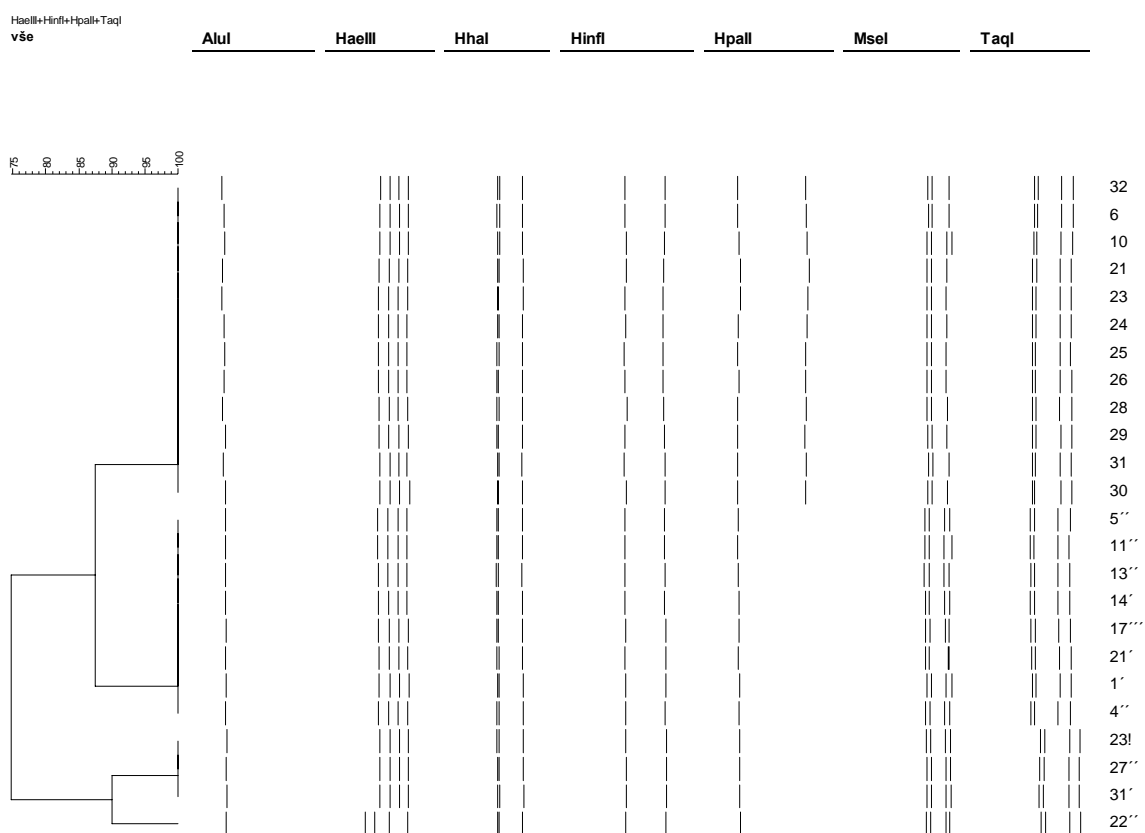
Po ozáření gelu v UV transluminátoru byly na gelu patrné tři fragmenty naštípaného PCR produktu délky 750 bp a 7 fragmentů ampliconu velikosti 880 bp. Velkosti fragmentů získaných digescí enzymem *MseI* jsou uvedeny v tabulce 19. Ukázka gelu s fragmenty získanými štěpením vzorků kvasinek touto restriktázou je na obrázku 33.



**Obr. 33:** Ukázka štěpení PCR produktu délky 880 bp (31, 32, 6) a 750 bp (3 13, 11) restriční endonukleázou *MseI*.

## 4.2.5 Dendrogramy kvasinek izolovaných z vína

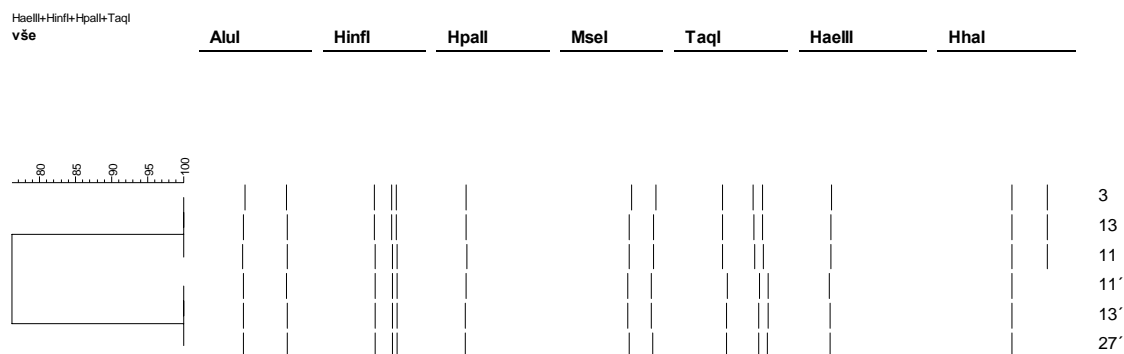
### 4.2.5.1 Dendrogram rodu *Saccharomyces*



**Obr. 34:** Dendrogram genetické podobnosti kvasinek rodu *Saccharomyces* izolovaných z vína, sestavený na základě výsledků RFLP – pro enzymy *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *Taq<sup>α</sup>I* a *HinfI*.

Genetická podobnost identifikovaných kvasinek taxonomicky zařazených do rodu *Saccharomyces* je znázorněná pomocí dendrogramu sestaveného na základě výsledků metody RFLP (obr. 34). Dendrogram byl vytvořen v programu BioNumerics, kde pro kritérium podobnosti byly zvoleny Jaccardovy koeficienty podobnosti. V rámci zvolené 5% tolerance (důvodem je srovnání výsledků z různých gelů) byly kvasinky náležící do tohoto rodu rozděleny do čtyř skupin a to vzájemným porovnáním fragmentů DNA získaných štěpením všemi sedmi restrikcími endonukleázami. První, druhou i třetí skupinu kvasinek (6, 10, 21 – 32; 5'', 11'', 13'', 14', 17''', 21', 1', 4''; 23!, 27'', 31') není možné od sebe druhově odlišit, protože štěpené fragmenty byly vždy totožné. Kvasinka s označením 22'' byla jako jediný vzorek rodu *Saccharomyces* rozdílně štěpena enzymem *HaeIII* a tudíž podle dendrogramu je zhruba na úrovni 90 % podobnosti odlišitelná od ostatních kvasinek, nicméně tato varianta se neobjevila u typových kvasinek, takže není možné říci o jaký druh se jedná. Kvasinky, které nelze v našem případě od sebe odlišit jsou v dendrogramu znázorněny svislou čarou na dané procentuální úrovni podobnosti.

#### 4.2.5.2 Dendrogram rodu *Hanseniaspora*



**Obr. 35:** Dendrogram genetické podobnosti kvasinek rodu *Hanseniaspora* izolovaných z vína, sestavený na základě výsledků RFLP – pro enzymy *AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *Taq<sup>α</sup>I* a *HinfI*.

Na základě výsledků získaných štěpením amplifikované DNA jednotlivými restričními endonukleázami byly pomocí programu BioNumerics sestaveny dendrogramy, které ukazují genetickou podobnost jednotlivých kvasinek.

Dendrogram vzorků kvasinek taxonomicky určených jako *Hanseniaspora uvarum* je na obr. 35. Jako kritérium při posouzení genetické podobnosti byly zvoleny Jaccardovy koeficienty s tolerancí 2 % na pozici fragmentu. Použitím těchto kritérií byly vytvořeny dvě skupiny kvasinek rodu *Hanseniaspora*, které jsou od sebe navzájem neodlišitelné. Tyto dvě vytvořené skupiny jsou potom od sebe odlišitelné na úrovni 72 % podobnosti, takže můžeme říci, že na 72 % tyto kvasinky od sebe všemi sedmi použitými restriktázami nedokážeme oddělit.

### 4.3 Taxonomické zařazení identifikovaných kvasinek

DNA kvasinek vyizolovaných z vína v různých fázích kvašení byla naamplifikována a podrobena restriční analýze. Porovnáním fragmentů získaných enzymovým štěpením typových kvasinek s restričními fragmenty kvasinek izolovanými z vína byly kvasinky následně taxonomicky zařazeny.

V tabulce 20 jsou uvedeny výsledky. Modře jsou stínovány vzorky, které po přečištění odpovídají nepřечиštěnému vzorku, červeně je zvýrazněn vzorek s odlišným štěpením vzhledem k ostatním PCR produktům délky 880 bp. Vzorek 22" byl jako jediný vzorek kvasinek rodu *Saccharomyces* odlišně štěpen enzymem *HaeIII*.

Srovnáním naštěpených fragmentů vzorků kvasinek izolovaných z vína s výsledným obrazem štěpení typových kvasinek byly vzorky identifikovány. Vzorky 3, 11, 13, 27' byly druhově taxonomicky zařazeny. Srovnáním restričních fragmentů vzorků s typovými kvasinkami lze konstatovat, že se jedná o kvasinky *Hanseniaspora uvarum*. Štěpení DNA u přečištěného vzorku s označením 11' odpovídá 11 a 13' odpovídá vzorku 13.

Ostatní vzorky byly zařazeny do rodu *Saccharomyces*. U těchto vzorků nebylo možné jejich druhové taxonomické zařazení. I když všechny vzorky byly štěpeny shodně, nelze v našem případě s jistotou říct, že ve všech případech se jedná o kvasinku *S. cerevisiae*. Důvodem druhového nezařazení je shodnost štěpení různých druhů typových kvasinek rodu *Saccharomyces* u všech sedmi použitých restričních endonukleáz. Porovnání restričních fragmentů vzorků a typových kvasinek v tomto případě vede pouze k rodovému zařazení.

V tabulce 20 jsou stínovány modře vzorky, které byly před a po přečištění štěpeny shodně. Štěpení vzorku 23 odpovídá přečištěnému 23!; 21 odpovídá 21'; 31 odpovídá 31'.

**Tab. 20:** Tabulka identifikovaných kvasinek izolovaných z vína v různých fázích kvašení.

O	PO	Kvasinka	O	PO	Kvasinka
Listy	3	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	7. den	5"	<i>Saccharomyces</i> sp.
	11	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		22"	<i>Saccharomyces</i> sp.
	11'	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	9. den	25	<i>Saccharomyces</i> sp.
	11"	<i>Saccharomyces</i> sp.		30	<i>Saccharomyces</i> sp.
	17'''	<i>Saccharomyces</i> sp.	11. den	23	<i>Saccharomyces</i> sp.
1. den	10	<i>Saccharomyces</i> sp.		23!	<i>Saccharomyces</i> sp.
	4"	<i>Saccharomyces</i> sp.		32	<i>Saccharomyces</i> sp.
	14'	<i>Saccharomyces</i> sp.	13. den	21	<i>Saccharomyces</i> sp.
3. den	13	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		21'	<i>Saccharomyces</i> sp.
	13'	<i>Hanseniaspora uvarum</i>		24	<i>Saccharomyces</i> sp.
	13"	<i>Saccharomyces</i> sp.	15. den	31	<i>Saccharomyces</i> sp.
5. den	6	<i>Saccharomyces</i> sp.		31'	<i>Saccharomyces</i> sp.
	27'	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	17. den	26	<i>Saccharomyces</i> sp.
	27"	<i>Saccharomyces</i> sp.	19. den	28	<i>Saccharomyces</i> sp.
7. den	1'	29		<i>Saccharomyces</i> sp.	



#### 4.4 Jiná možnost odlišení kvasinek rodu *Saccharomyces*

Amplifikací oblasti 5·8S ITS rDNA nebylo možné odlišit a druhově zařadit kvasinky rodu *Saccharomyces*. Enzym *Hae*III sice dokázal odlišit jednu kvasinku (22"), nicméně tato kvasinka nemohla být porovnána s žádnou typovou kvasinkou, protože obraz štěpení enzymem *Hae*III všech typových kvasinek spadajících do tohoto rodu byl zcela totožný a tudíž se neshodoval s odlišným obrazem štěpení kvasinky 22". Vzorky kvasinek izolovaných z vína, které byly amplifikovány na délku 880 bp byly z hlediska stejného štěpení všemi sedmi restrikčními endonukleázami zařazeny pouze rodově. Ve snaze druhového odlišení byla pro amplifikaci zvolena jiná oblast DNA. Za tímto účelem byly k amplifikaci použity primery SC1 a SC2, jejichž sekvence jsou uvedeny v tab. 21. Postup izolace, amplifikace, přečištění, restrikční analýzy, detekce PCR produktů a restrikčních fragmentů se shodoval jako při použití primerů ITS1 a ITS4.

Z hlediska krátkého časového úseku bylo pro analýzu zvoleno 9 typových kvasinek rodu *Saccharomyces*. Seznam typových kvasinek, výsledné elektroforeogramy PCR produktů a restrikčních fragmentů jsou uvedeny v příloze 3 a 4.

Analyzováno bylo 9 typových kvasinek rodu *Saccharomyces*. Jak už bylo zmíněno, k amplifikaci byly použity primery SC1 a SC2. PCR produkt byl dále analyzován za použití 4 restrikčních endonukleáz – *Taq*<sup>o</sup>I, *Bsh*NI, *Hae*III a *Mse*I. Výsledné elektroforeogramy jsou uvedeny v příloze 4.

Štěpením PCR produktů restrikční endonukleázou *Taq*<sup>o</sup>I, *Bsh*NI, *Hae*III a *Mse*I byly po elektroforetické separaci na agarózovém gelu vidět stejné profily pásů u všech analyzovaných vzorků. Těmito enzymy opět nebylo možné odlišit kvasinky rodu *Saccharomyces* na základě druhu.

Druhové odlišení rodu *Saccharomyces* je velmi složité a nepodařilo se je odlišit ani amplifikací oblasti NTS2 – ITS rDNA pomocí primerů SC1 a SC2.

**Tab. 21:** Sekvence primerů SC1 a SC2 [78]

Primer	Sekvence
SC1	5' AAC GGT GCT TTC TGG TAG 3'
SC2	5' TGT CTT CAA CTG CTT T 3'

## 5 ZÁVĚR

Kvasinky lze charakterizovat na základě fyziologických, morfologických a biochemických vlastností nebo využít modernějších, rychlejších a v posledních letech čím dál více používaných metod založených na molekulární charakteristice těchto mikroorganismů. Za jednu z metod tzv. moderní taxonomie je považována metoda PCR-RFLP, jejíž aplikace byla využita v této práci k identifikaci a taxonomickému zařazení vinných kvasinek.

V práci bylo k analýze použito 63 typových kvasinek pocházejících ze sbírky CCY Bratislava, ze kterých byla za pomoci komerčního setu vyizolována DNA. K amplifikaci byla zvolena kódující oblast 5·8S-ITS rDNA a primery ITS1, ITS4. Po přečištění byla amplifikovaná DNA podrobena restriční analýze, díky které došlo k naštipání DNA na specifické fragmenty charakteristické pro daný druh. Výsledný obraz fragmentů dělených elektroforeticky v 2% agarózovém gelu byl následně srovnán se stejným způsobem připravenými vzorky kvasinek izolovaných z bobulí, listů, půdy a bílého vína v průběhu kvasného procesu. Oblastí monitoringu kvasinek účastnících se spontánního kvašení byly Velké Pavlovice. Tato oblast byla monitorována v diplomových pracích v minulém roce, nicméně některé kvasinky nebyly zařazeny nebo byly identifikovány nesprávně. Aby byl monitoring kvasného procesu dokončen, bylo potřeba charakterizovat asi 30 vinných kvasinek. Podle velikosti fragmentů po PCR byly vinné kvasinky rozděleny do skupin – *Saccharomyces* + *Hanseniaspora*; *Pichia* + *Rhodotorula*. Cílem této práce bylo identifikovat vinné kvasinky rodu *Saccharomyces* a *Hanseniaspora*. Výsledky a diskuze jsou součástí kapitoly 4.

Podle získaných výsledků restriční analýzy za použití sedmi restričních endonukleáz a srovnáním s analyzovanými typovými kvasinkami bylo všech šest vinných kvasinek rodu *Hanseniaspora* druhově zařazeno jako *Hanseniaspora uvarum*. Zbylých 24 identifikovaných vzorků vinných kvasinek bylo možno zařadit pouze rodově. Tato skupina byla identifikována jako kvasinky rodu *Saccharomyces*. Druhové zařazení v tomto případě nebylo možné ani u jednoho vzorku kvasinky. Kvasinka s označením 22" sice byla rozdílně štěpena enzymem *HaeIII* vzhledem k ostatním vzorkům této skupiny kvasinek, nicméně nebylo možné ji porovnat s délkami fragmentů typových kvasinek, protože obraz štěpení enzymem *HaeIII* byl u všech typových kvasinek rodu *Saccharomyces* zcela totožný. Srovnáním délek fragmentů DNA tohoto vzorku kvasinky s délkami fragmentů naštipanými stejnou restriktázou uvedenými v publikaci [6] by se mohlo jednat o kvasinku *Saccharomyces bayanus*. Nicméně porovnáním s našimi typovými kvasinkami se to potvrdit nepodařilo.

Amplifikací oblasti 5·8S-ITS rDNA za použití primerů ITS1 a ITS4 nebylo možné odlišit na úrovni druhu kvasinky rodu *Saccharomyces* a to ani jednou z použitých sedmi restriktáz. Za účelem druhového odlišení a zařazení byla k amplifikaci zvolena nekódující oblast. K amplifikaci byly použity primery SC1 a SC2 (amplifikující oblast NTS2 – ITS). Bylo analyzováno 9 druhů typových kvasinek rodu *Saccharomyces*. Amplifikovaná DNA byla aplikací čtyř restričních endonukleáz (*Taq<sup>o</sup>I*, *BshNI*, *HaeIII* a *MseI*) podrobena restriční analýze. Výsledkem byl však opět zcela shodný obraz restričních fragmentů a to za použití všech čtyř restriktáz. V rámci předchozích diplomových prací byla DNA amplifikována primery Lev1, Lev2, nicméně tyto primery nejsou taktéž vhodné. Druhové odlišení rodu *Saccharomyces* je tedy velmi složité a nepodařilo se amplifikací primery IT1, ITS4 ani pomocí primerů SC1, SC2. Za účelem druhového odlišení kvasinek rodu *Saccharomyces* je

zapotřebí volit jinou metodu identifikace (např. sekvencování) nebo se pokusit amplifikovat jinou oblast.

Vzorky kvasinek izolovaných z vína byly pro srovnání hodnoceny i za pomoci tradičních testů. Pomocí fyziologických testů, provedených pracovníky Sbírkou kvasinek uložené na Chemickém ústavu SAV Bratislava, bylo všech šest vzorků kvasinek rodu *Hanseniaspora* zařazeno jako také *Hanseniaspora uvarum* a kvasinky rodu *Saccharomyces* byly stejně jako v našem případě zařazeny pouze rodově. Druhové zařazení je pomocí tradiční taxonomie velmi obtížné a tudíž se volí nové metody odlišení.

Pro posouzení genetické podobnosti jednotlivých rodů kvasinek byly vytvořeny použitím programu BioNumerics dendrogramy. Pomocí UPGMA klastrové neboli shlukové analýzy můžeme nalézt skupiny, které jsou si blízké nebo velmi podobné. Na základě jejich vlastností jsou potom druhy sloučeny do skupin. Ve výsledku jsme byli schopni porovnat genetickou podobnost a odlišitelnost mezi druhy daného rodu a to na dané procentuální úrovni podobnosti. Dendrogramy byly vytvořené pro rod *Saccharomyces* a *Hanseniaspora* a to jak pro typové kvasinky, tak i pro vzorky kvasinek izolovaných z vína.

Kvasinky rodu *Hanseniaspora* a *Saccharomyces* byly identifikovány v různých dnech kvašení. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 20. Souhrnně lze však říci, že apikulární kvasinky *H. uvarum* se objevily jen v prvních stádiích kvašení a to do 5. dne fermentačního procesu. V pozdějších stádiích fermentace se vyskytovaly už jen kvasinky rodu *Saccharomyces*. Toto hodnocení je však pouze v rámci mých výsledků. Pokud bych měla zhodnotit celý kvasný proces bílého vína oblasti Velké Pavlovice nemohu posuzovat pouze své výsledky, ale spojit výsledky ze všech diplomových prací zaměřených na identifikaci kvasinek této oblasti. Monitoring kvasinkové populace byl zaměřen na matrice (bobule, listy a půdu) a průběh kvasného procesu. Na bobulích se vyskytovaly převážně kvasinky rodu *Pichia* (*P. fermentans*), dále *H. uvarum* a byla zde nalezena taktéž kvasinka *T. delbrueckii*. Na listech to byl v převaze *A. pullulans*, *R. glutinis* a v půdě byly nalezeny *R. glutinis* a *T. delbrueckii*. Průběh kvasného procesu (monitorován 19 dnů vždy ob den) lze zhodnotit následovně. Na začátku kvašení se do procesu zapojily převážně kvasinky rodu *Pichia*, *Hanseniaspora* a *Rhodotorula*. Apikulární kvasinky se účastnily procesu fermentace až do 9. dne. V 9. – 19. dnu monitoringu kvašení byly v moštu identifikovány již pouze kvasinky rodu *Saccharomyces*. Souhrnně lze tedy říci, že v devátém dnu procesu kvašení byla již koncentrace alkoholu tak vysoká, že se do procesu zapojily pouze kvasinky rodu *Saccharomyces*, a to díky své vysoké toleranci k ethanolu.

Co se týče odlišení jednotlivých druhů typových kvasinek v rámci rodu, bylo zhodnocením všech sedmi restričních endonukleáz dospěno k závěru, že aplikací nejvíce enzymů (čtyř ze sedmi aplikovaných) lze bez problému odlišit analyzované druhy rodu *Pichia* (vhodné jsou enzymy *HaeIII*, *HhaI*, *Taq<sup>o</sup>I*, *MseI*), naproti tomu pro druhové odlišení rodu *Rhodotorula* se jeví být vhodný pouze enzym *HinI* a k odlišení druhů rodu *Hanseniaspora* jsou nejvhodnější restriktázy *Taq<sup>o</sup>I* a *AluI*. Pro druhové zařazení kvasinek náležících do rodu *Saccharomyces* nebyla nalezena vhodná restriktáza.

Metoda PCR-RFLP je hodnocena jako účinný nástroj identifikace vinných kvasinek. Metoda má své výhody, ale i nevýhody. Výhodou metody je její snadná aplikace, rychlost taxonomického zařazení v porovnání s tradiční taxonomií a malá pravděpodobnost chybné identifikace. Snaha metodu zdokonalit vede k postupnému zjednodušování. Jsou navrhovány rychlejší postupy, jako je např. aplikace pětiminutových restriktáz, kdy doba analýzy se zkrátí min. o 16 hodin, dále analýza DNA bez předchozí kultivace kvasinek, kdy se opět doba

identifikace zkracuje a to minimálně o tři dny. Nevýhodou metody je použití mutagenního barviva ethidium bromidu. Nicméně tento problém je také řešen a k vizualizaci DNA fragmentů na gelu jsou navrhována jiná zdravotně bezpečná barviva (například SYBR green apod.).

Metoda PCR-RFLP je sice vhodná k taxonomickému zařazování mikroorganismů, nicméně amplifikace oblasti 5.8S-ITS rDNA za použití primerů ITS1 a ITS4 se osvědčila pouze ke klasifikaci apikulárních kvasinek.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GONZÁLES, S.; GALLO, L.; KLIMENT, D.; BARDKO, E.; QUEROL, A.: *Enological characterization of natural hybrids from Saccharomyces cerevisiae and S. kudriavzevii*. International Journal of Food Microbiology. 2007, vol. 116, pp. 11 – 18.
- [2] BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.: *Yeasts in food*. Cambridge England: Woodhead Publishing Ltd, 2003. 487 p. ISBN 1 855573 706 X.
- [3] LOSKOTOVÁ, M.: *Využití kvasinkovitých mikroorganismů v moderních biotechnologiích* [online]. Přírodovědecká fakulta MU. Brno 2005. [cit. 2009-01-20], <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/kvasbiotech/spustit.html>>.
- [4] WALKER, T.: *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester: John Wiley and sons Ltd., 1998. 350 p. ISBN 0-471-96446-8.
- [5] HIERRO, N.; GONZÁLES, Á.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M.: *New PCR-based methods for yeast identification*. Journal of Applied Microbiology. 2004, vol. 97, pp. 792 – 801.
- [6] ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLECH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A.: *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. International Journal of Systematic Bacteriology. 1999, vol. 49, pp. 329 – 337.
- [7] GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENZINI, M.: *Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis rDNA ITS region*. Journal of Applied Microbiology. 1999, vol. 87, pp. 949 – 956.
- [8] CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P.: *Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-Saccharomyces wine species*. International Journal of Food Microbiology. 2003, vol. 84, pp. 33 – 39.
- [9] DLAUCHY, D., TORNAI-LEHOCZKI, J., PÉTER, G.: *Restriction Enzyme Analysis of PCR Amplified rDNA as a Taxonomic Tool in Yeast Identification*. Systematic and Applied Microbiology. 1999, vol. 22, pp. 445-453.
- [10] KLABAN, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [11] ZDEŇKOVÁ, M.: *Identifikace kvasinek rodu Saccharomyces během kvašení bílého vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 63 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

- [12] FELDMANN, H.: *Yeast Molecular Biology*. Adolf-Butenandt-Institute University of Munich. 2005. [cit. 2009-01-06]. Dostupný z WWW: <[http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast\\_Biol/](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/)>.
- [13] ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [14] HUDECOVÁ, D.; MAJTÁN, V.: *Mikrobiológia I*. Bratislava: Vydavateľství STU, 2002. 189 s. ISBN 80-227-1663-4.
- [15] KOČKOVÁ, A.: *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy*. 1. vydání. Bratislava: Alfa, 1982. 483 s.
- [16] JACKSON, R. S.: *Wine Science*. 3<sup>rd</sup> ed. Academic Press. 2008. 776 s. ISBN 0-1237-3646-3.
- [17] FLEET, G.H.: *Wine: Microbiology and Biotechnology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: CRC Press, 1993. 510 p. ISBN 0-415-27850-3.
- [18] POLO, C.: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, 2008. 550 p. ISBN 038774116X.
- [19] PIZARRO, F.; VARGAS, F. A.; AGOSIN, E.: *A systems biology perspective of wine fermentations*. *Yeasts* 2007, vol. 24, pp. 977 – 991.
- [20] GUILLAMÓN, J. M., SABATÉ, J., BARRIO, E., CANO, J., QUEROL, A.: *Rapid identification of wine yeasts species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region*. *Arch Microbiol.* 1998, vol. 169, pp. 387 – 392.
- [21] WOOD, J. B.: *Microbiology of Fermented Foods*. 2<sup>nd</sup> ed. Springer. 1998. 852 p ISBN 0-7514-0216-8.
- [22] ZIMMERMANN, F. K.; ENTIAN K. D.: *Yeast sugar metabolism*. CRC Press, 1997. 567 p. ISBN 1-56676-466-1.
- [23] RASPOR, P.; MILEK, D. M.; POLANC, J.; MOŽINA, S. S; ČADEŽ, N.: *Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia*. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, vol. 109, pp. 97 – 102.
- [24] HIERRO, N.; GONZÁLEZ, Á.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.: *Diversity and evolution of non-Saccharomyces yeast populations during wine fermentation: effect of grape ripeness and cold maceration*. *FEMS YEAST Res.* 2006, vol. 6, pp. 102 – 111.
- [25] VAZQUEZ, F., FIGUEROA, L., TORO, M. E.: *Enological characteristic of Yeasts*. *Food Microbiology Protocols*. 2000, vol. 14, pp. 297 – 306.

- [26] FUGELSAANG, K. C.; EDWARDS Ch. G: *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer, 2007. 395 s. ISBN 0-387-33341-x.
- [27] GÖRNER, F.; VALÍK, L.: *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. 1. vydání. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [28] PHISTER, T.; RAWSTHORNE, H.; JOSEPH, L.; MILLS, D. A.: *Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of Hanseniaspora Species from Wine and Juice*. American Journal of Enology and Viticulture. 2007, vol. 58; no 2, pp. 229-233.
- [29] ZOECKLEIN, B. W.: *Wine analysis and production*. New York: Springer Science & Business, 1994. 621 p. ISBN 0-8342-1701-5.
- [30] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: vydavateľstvo ALFA, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [31] CHUMCHALOVÁ, J., et al.: *Miniatlas mikroorganizmů* [online]. 24. ledna 2008 [cit. 2009-02-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/obsah.htm>>.
- [32] KUTTELVAŠER, Z.: *Abeceda vína*. 2. vydání. Praha: Radix, spol. s r. o., 2003. 280 s., 16 s. příloh. ISBN 80-86031-43-8.
- [33] NGUYEN, H.-V.; GAILLARDIN, C.: *Two Subgroups within the Saccharomyces bayanus Species Evidence by PCR Amplification and Restriction Polymorphism of the Non-Transcribed Spacer 2 in the Ribosomal DNA Unit*. System. Appl. Microbiol. 1997, vol. 20, pp. 286 – 294.
- [34] JOSEPA, S., GUILLAMON, J., CANO, J.: *PCR differentiation of Saccharomyces cerevisiae from Saccharomyces bayanus/Saccharomyces pastorianus using specific primers*. FEMS Microbiology Letters. 2000, vol. 193, pp. 255 – 259.
- [35] BRITO DOS SANTOS, S. K.; BASÍLIO, A.; BRASILIERO, B.; SIMÕES, D.; SILVA-FILHO, E.; MORAIS, M.: *Identification of yeasts within Saccharomyces sensu stricto complex by PCR-fingerprinting*. World J Microbiol Biotechnic. 2007, vol. 23, pp. 1613 – 1620.
- [36] RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; KANEKO, Y.: *Saccharomyces sensu stricto: Systematics, Genetic Diversity and Evolution*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2003, vol. 96, pp. 1 – 9.
- [37] DEÁK, T.: *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, 2007. 325 p. ISBN 1-4200-4493-1.
- [38] KLABAN, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.

- [39] CARETTE, J.: *De la trappe au verre*. Editions Publibook, 2005. 555 p. ISBN 2748306988.
- [40] HORNSEY, I. S.: *The Chemistry and Biology of Winemaking*. Royal Society of Chemistry, 2007. 457 p. ISBN 0854042660.
- [41] NAUMOV, G., JAMES, S., NAUMOVA, E., LOUIS, E., ROBERTS, N.: *Three new species in the Saccharomyces sensu stricto komplex: Saccharomyces cariocanus, Saccharomyces kudriavzevii and Saccharomyces mikatae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2000, vol. 50, pp. 1931 – 1942.
- [42] FERNÁNDEZ M. T.; UBEDA J. F.; BRIONES A. I.: *Comparative study of non-Saccharomyces microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods*. FEMS Microbiology Letters. 1999, vol. 173, pp. 223 – 229.
- [43] GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENZINI, M.: *Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region*. Journal of Applied Microbiology. 1999, vol. 87, pp. 949 – 956.
- [44] HERAZ-VAZQUEZ, F. J.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; CLEMENTE-JIMENEZ, J. M.; RODRIGUEZ-VICO, F.: *Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers*. FEMS Yeast Research. 2003, vol. 3, pp. 3 – 9.
- [45] ANTUNOVICA, Z.; IRINYI, L.; SIPICZKI, M.: *Combined application of methods to taxonomic identification of Saccharomyces strains in fermenting botrytized grape must*. Journal of Applied Microbiology. 2005, vol. 98, pp. 971 – 979.
- [46] PRŮŠA, R., et al.: *Multimediální učebnice DNA diagnostiky* [online]. 1. vydání. Praha : 2. lékařská fakulta UK, 1998, 5. února 2007 [cit. 2009-02-20]. Dostupný z WWW: <<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/newlook/default.htm>>.
- [47] MITRA, S.: *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Wiley – IEEE, 2003. 458 p. ISBN 0471328456.
- [48] *MO BIO Laboratories* [online]. 2005, 6. května 2009 [cit. 2009-03-06]. Dostupný z WWW: <<http://www.mobio.com/files/protocol/12224.pdf>>.
- [49] ŠMARDA, J.; DOŠKAŘ, J.; PANTŮČEK, J. RŮŽIČKOVÁ, V.; KOPTÍKOVÁ, V.: *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [50] KUČHTA, T.; DRAHOVSKÁ, H.; PANGALLO, D.; SIEKEL, P.: *Application of Polymerase Chain Reaction to food analysis*. 1. vydání. Bratislava: Výskumný ústav potravinárský, 2006. 105 s. ISBN 80-969608-5-7.



- [51] CAMPBELL, N. A.; REECE, J. B.: *Biologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, a.s., 2006. 1332 p. ISBN 80-251-1178-4.
- [52] MANZ, A.; PAMME, N.; IOSSIFIDIS, D.: *Bioanalytical Chemistry*. Imperial College Press, 2004. 201 p. ISBN 1-86094-371-3.
- [53] KRÁLOVÁ, B.; FUKAL, L.; RAUCH, P.; RUMML, T.: *Bioanalytické metody*. 3. přepracované vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. 254 s. ISBN 80-7080-449-1.
- [54] ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., WALTER, P., ROBERTS, K., RAFF, M.: *Základy buněčné biologie*. 2.vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s r.o. ISBN 80-902906-2-0.
- [55] SACHSE, K.; FREY, J.: *PCR detection of microbial pathogens*. Humana Press, 2003. 334 p. ISBN 1-58829-049-2.
- [56] WALKER, J. M.; RAPLEY, R.: *Molecular Biology and Biotechnology*. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006. 563 p. ISBN 0-85404-606-2.
- [57] COCOLIN, L.; ERCOLINI, D.: *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Springer, 2007. 284 p. ISBN 038774519x.
- [58] HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; THRANE, U.: *Advances in Food Mycology*. Springer, 2006. 371 p. ISBN 0387283854.
- [59] QUEROL, A. FLEET, G. H.: *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, 2006. 453 p. ISBN 3-540-28388-9.
- [60] JEUNE, CH., ERNY, C., DEMUYTER, C., LOLLIER, M.: *Evolution of the population Saccharomyces cerevisiae from grape to wine in a spontaneous fermentation*. Food Microbiology. 2006, vol. 23, pp. 709 – 716.
- [61] MEYER, R. A.: *Molecular Biology and Biotechnology*. Wiley – VCH, 1995. 1072 p. ISBN 0-471-18634-1.
- [62] HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G.: *Food Biotechnology*. Wiley – IEEE, 1995. 952 p. ISBN 0-471-18570-1.
- [63] PRŮŠA, R.; LÁNY, J.; VEJVALKA, J.; KARGER, V.; KOTAŠKA, K.: *Multimediální učebnice DNA diagnostiky*. 1. vydání. Praha: 2. lékařská fakulta UK, 1998. Dostupné z WWW: <<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/>>.
- [64] WESTERMEIER, R.: *Electrophoresis in Practice*. 4<sup>th</sup> ed. Wiley – VCH, 2006. 406 p. ISBN 3527311815.
- [65] TIETZ, D.: *Nucleic Acid Electrophoresis*. Springer, 1998. 328 p. ISBN 3540639594.

- [66] SUN, S. F.: *Physical Chemistry of Macromolecules*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley – IEEE, 2004. 549 p. ISBN 0471281387.
- [67] BOOTH, C.; BERGAN, T.; BENNETT, P. M.; BROWN, A. J. P.; RITA, R.: *Methods in Microbiology*. Academic Press, 1970. ISBN 01252215193.
- [68] HIERRO, N.; GONZÁLEZ, Á.; MASS, A.; GUILLAMÓN, J. M.: *New PCR-based methods for yeast identification*. Journal of Applied Microbiology. 2004, vol. 97, pp. 792 – 801.
- [69] ESPINOSA, J., FERNANDEZ-GONZALEZ, M., UBEDA, J., BRIONES, A.: *Identification of Wine Yeasts by PCR-RFLP without Previous Isolation on Plate*. Food Technol. Biotechnic. 2002, vol. 40 (2), pp. 157 – 160.
- [70] MARTORELL, P.; QUEROL, A.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.: *Rapid Identification and Enumeration of Saccharomyces cerevisiae Cells in Wine by Real-Time PCR*. Applied and Environmental Microbiology. 2005. vol. 71. pp. 6823 – 6830.
- [71] *Fermentas : Molecular Biology Products* [online]. 2006, 24. února 2009 [cit. 2009-03-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/generulers.htm#100bpplus>>.
- [72] *MO BIO Laboratories* [online]. 2005, 6. května 2009 [cit. 2009-03-21]. Dostupný z WWW: <[http://www.mobio.com/files/protocol/17020-40\(1\).pdf](http://www.mobio.com/files/protocol/17020-40(1).pdf)>.
- [73] *MO BIO Laboratories* [online]. 2005, 6. května 2009 [cit. 2009-03-21]. Dostupný z WWW: <<http://www.mobio.com/files/protocol/17200-100.pdf>>.
- [74] BĚLOCHOVÁ, K. *Metoda RFLP-PCR umožňující identifikaci a taxonomické zařazení kvasinek rodu Saccharomyces*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- [75] *BioSystematica : Gel Imagers & Gel Analysis* [online]. 2009, 30. dubna 2009 [cit. 2009-04-30]. Dostupný z WWW: <<http://www.biosystematica.com/bionumer.htm>>.
- [76] *Mnohorozměrná statistická analýza dat* [online]. 8. května 2009 [cit. 2009-05-08]. Dostupný z WWW: <[www.kee.fpv.ukf.sk/files/mnohoroz\\_analyza\\_pred.ppt](http://www.kee.fpv.ukf.sk/files/mnohoroz_analyza_pred.ppt)>.
- [77] *VÚCHS* [online]. 14. dubna 2009 [cit. 2009-05-03]. Dostupný z WWW: <[http://www.vuchs.cz/publikace/metodiky/QF4004\\_UM2.pdf](http://www.vuchs.cz/publikace/metodiky/QF4004_UM2.pdf)>.
- [78] NAVRÁTILOVÁ, J. *Metoda RFLP-PCR jako nástroj k identifikaci kvasinek rodu Saccharomyces*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2006. 64 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	riboxynuklevá kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů
RAPD	polymorfismus náhodně amplifikované DNA
ESM	elektronový skenovací mikroskop
$a_w$	aktivita vody
CDC	označení genu, z angl. cell division cycle
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>R.</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>P.</i>	<i>Pichia</i>
<i>I.</i>	<i>Issatchenkia</i>
<i>Z.</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
AFLP	polymorfismus amplifikované délky fragmentů
RT-PCR	PCR v reálném čase (z angl. Real-Time PCR)
MK	mastné kyseliny
SDS	dodecylsulfát sodný
dsDNA	dvouřetězcová DNA
G	guanin
C	cytosin
A	adenin
T	thimin
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dGTP	deoxyguanintrifosfát
dTTP	deoxythimintrifosfát
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
rDNA	ribosomální DNA
ITS	vnitřní přepisová oblast (z angl. internal transcribed spacer)
RE	restriční endonukleáza
bp	počet páru bází
kb	počet kilobází
UV	ultrafialové záření
PCR-ISS	intron splice site PCR
ERIC-PCR	enterobakteriální opakující se intergenové shodné sekvence PCR
REP-PCR	interrepetitivní PCR (z angl. repetitive extragenic palindromic PCR)
RE	restriční endonukleáza
°ČSN	český normalizovaný moštoměr
EtBr	ehidium bromid
M	marker neboli délkový standard 100 bp, 100 bp plus
V	jednotka napětí
nk	negativní kontrola

PO	pracovní označení vzorku
AP	velikost amplifikovaného produktu
RF	velikost restrikčního fragmentu
pk	pozitivní kontrola
n	neštěpeno
M1	délkový standard 20 bp
<i>Sp.</i>	<i>Sporidiobolus</i>
O	odběr
<i>A.</i>	<i>Aureobasidium</i>
<i>T.</i>	<i>Torulospora</i>

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

**Příloha 1:** Seznam typových kvasinek.

**Příloha 2:** Vzorky – pracovní označení + den odběru.

**Příloha 3:** Seznam typových kvasinek použitých k amplifikaci nekódující oblasti.

**Příloha 4:** Elektroforeogramy DNA po amplifikaci primery SC1-SC2 a restrikční analýze.

**Příloha 5:** Délky fragmentů DNA po restrikční analýze pro typové kvasinky.

**Příloha 6:** Délky fragmentů získaných na základě analýzy RFLP u vzorků kvasinek izolovaných z vína.

## 9 PŘÍLOHY

### Příloha 1: Seznam typových kvasinek.

*Tab. 1: Seznam typových kvasinek.*

<b>Pracovní označení</b>	<b>Rod</b>	<b>Druh</b>	<b>CCY</b>
s1	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	20-2-22
s2	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	20-2-28
s3	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	20-2-31
s4	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	No.18
s5	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	20-2-34
s6	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	No.269
s7	<i>Pichia</i>	<i>mambranifaciens</i>	No.92
s8	<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>	21-3-1
s9	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-13
s10	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-77
s11	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-81
s12	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	No.109
s13	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	No.242
s14	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	No.250
s15	<i>Hanseniaspora</i>	<i>valbyensis</i>	25-1-1
s16	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	46-3-15
s17	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	25-6-22
s18	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	46-3-4
s19	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	46-3-13
s20	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	No.97
s21	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	No.124
s23	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	No.131 <sub>1</sub>
s24	<i>Saccharomyces</i>	<i>mangini</i>	21-11-4
s25	<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	39-4-2
s26	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	46-3-3
s27	<i>Rhodosporidium</i>	<i>toruloides</i>	62-2-4
s28	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	25-6-12
s29	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	25-6-1
s30	<i>Sporidiobolus</i>	<i>pararoseus</i>	19-9-2
s31	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	20-2-24
s32	<i>Rhodotorula</i>	<i>mucilaginoso</i>	20-1-32
s33	<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	39-4-1
s34	<i>Pichia</i>	<i>subpelliculosa</i>	38-5-6
s35	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	25-6-12
s36	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	46-3-2
s37	<i>Pichia</i>	<i>subpelliculosa</i>	38-5-1
s38	<i>Sporidiobolus</i>	<i>salmonicolor</i>	19-5-1

**Tab. 1: Pokračování.**

<b>Pracovní označení</b>	<b>Rod</b>	<b>Druh</b>	<b>CCY</b>
s39	<i>Hanseniaspora</i>	<i>vinae</i>	25-8-5
s40	<i>Hanseniaspora</i>	<i>guilliermondii</i>	25-9-4
s41	<i>Sporidiobolus</i>	<i>roseus</i>	19-6-16
s42	<i>Rhodotorula</i>	<i>minuta</i>	20-11-22
s43	<i>Rhodotorula</i>	<i>graminis</i>	20-14-7
s44	<i>Pichia</i>	<i>guilliermondii</i>	39-23-5
s45	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	109
s46	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	235
s47	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	242
s48	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	244
s49	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	250
s50	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	18
s51	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	227
s52	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	259
s53	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	292
s54	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	20-2-34
s55	<i>Rhodotorula</i>	<i>glutinis</i>	20-1-35
s56	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-96
s57	<i>Issatchenkia</i>	<i>orientalis</i>	29-9-32
s58	<i>Saccharomyces</i>	<i>aceti</i>	21-46-1
s59	<i>Saccharomyces</i>	<i>oviformis</i>	21-21-43
s60	<i>Saccharomyces</i>	<i>chevalieri</i>	21-11-1
s61	<i>Saccharomyces</i>	<i>steineri</i>	21-12-3
s62	<i>Saccharomyces</i>	<i>pastorianus</i>	21-6-6
s63	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-13-1

**Příloha 2:** Vzorčky – pracovní označení + den odběru.

*Tab. 2: Pracovní označení vzorků kvasinek a den odběru během procesu kvašení vína.*

<b>Pracovní označení vzorku</b>	<b>Den odběru</b>
3	Listy
11	Listy
11'	Listy
11"	Listy
17'''	Listy
10	1. den
4"	1. den
14'	1. den
13	3. den
13'	3. den
13"	3. den
6	5. den
27'	5. den
27"	5. den
1'	7. den
5"	7. den
22"	7. den
25	9. den
30	9. den
23	11. den
23!	11. den
32	11. den
21	13. den
21'	13. den
24	13. den
31	15. den
31'	15. den
26	17. den
28	19. den
29	19. den



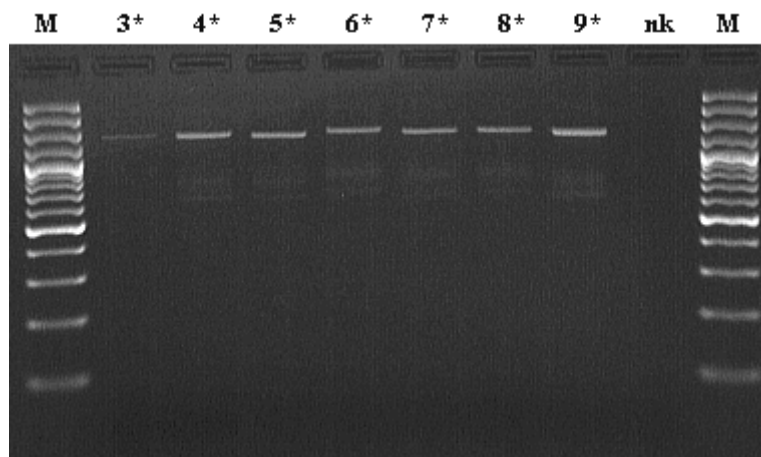
**Příloha 3:** Seznam typových kvasinek použitých k amplifikaci nekódující oblasti.

*Tab. 3: Seznam typových kvasinek.*

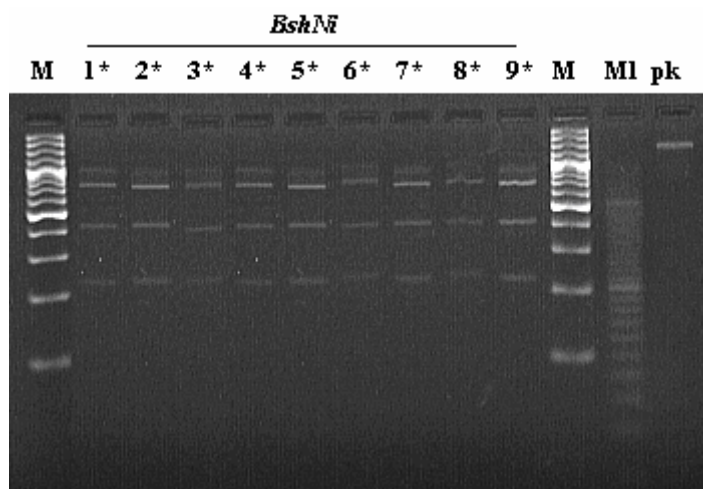
<b>Pracovní označení</b>	<b>Rod</b>	<b>Druh</b>	<b>CCY</b>
1*	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	21-4-81
2*	<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	No.109
3*	<i>Saccharomyces</i>	<i>mangini</i>	21-11-4
4*	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-13-1
5*	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-42-1
6*	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus</i>	21-31-13
7*	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus/cerevisiae</i>	28-91
8*	<i>Saccharomyces</i>	<i>bayanus/pastorianus</i>	48-82
9*	<i>Saccharomyces</i>	<i>chevalieri</i>	21-11-1

**Příloha 4:** Elektroforeogramy DNA po amplifikaci primery SC1-SC2 a restriční analýze.

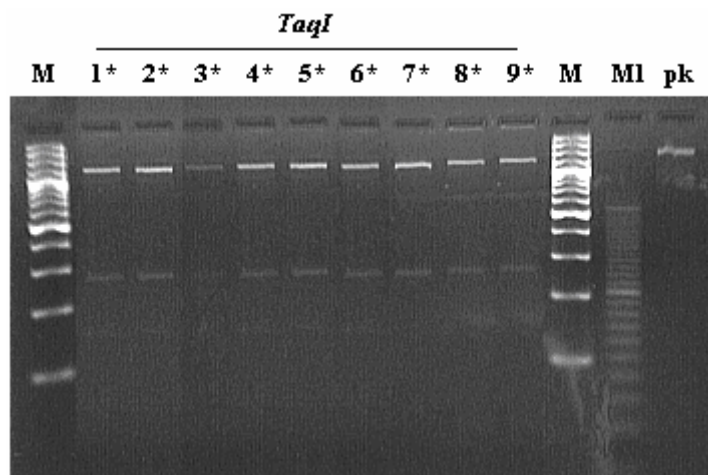
Pozn.: Dělení fragmentů DNA v elektrickém poli při konstantním napětí 55 V po dobu 2 hodiny.



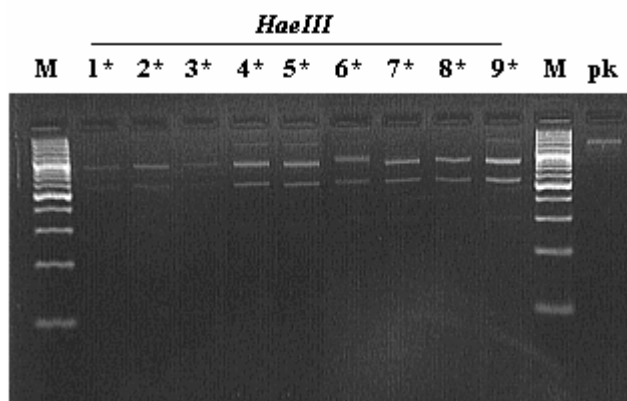
**Obr. 1:** Elektroforeogram fragmentů DNA amplifikovaných za použití primerů SC1 a SC2.  
M – délkový standard 100 bp plus, nk – negativní kontrola, 3\* – 9\* označení typových kvasinek.



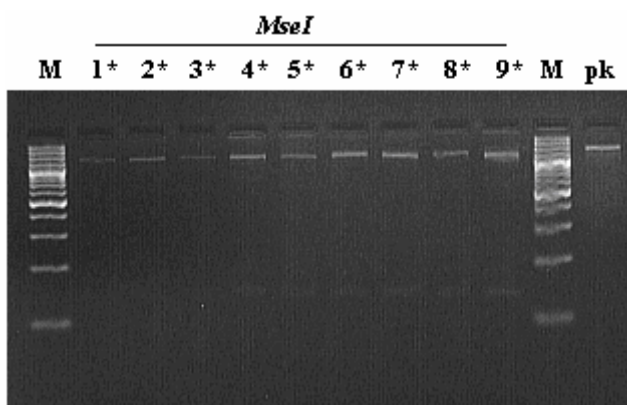
**Obr. 2:** Ukázka štěpení PCR produktů amplifikovanými primery SC1 a SC2 restriktázou BshNi.  
M – délkový standard 100 bp plus, M1 – délkový standard 20 bp, 1\* – 9\* pracovní označení typových kvasinek, pk – pozitivní kontrola (PCR produkt délky 1320 bp).



*Obr. 3: Elektroforeogram štěpení amplikonu restrikázou  $Taq^{\alpha}I$ .*



*Obr. 4: Elektroforeogram štěpení PCR produktů restrikční endonukleázou  $HaeIII$ .*



*Obr. 5: Elektroforeogram DNA fragmentů získaných štěpením restrikční endonukleázou  $MseI$ .*

**Příloha 5:** Délky fragmentů DNA po restrikční analýze pro typové kvasinky.

*Tab. 4: Souhrnná tabulka délky restrikčních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA typových kvasinek rodu Rhodotorula.*

číslo	PCR	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Taq</i> I	<i>Hinf</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Alu</i> I	<i>Mse</i> I
s1	650	n	300+220+100	340+220	220+120	n	300+110+90	450
s2	650	400+220	300+220+100	340+220	220+140+80	550	300+110+90	200+160+110
s3	650	400+220	300+220+100	340+220	220+140+80	550	300+110+90	450
s4	650	n	300+220+100	340+220	220+140+80	500+120	300+110+90	480+90+60
s5	650	n	300+220+100	340+220	220+120	n	300+110+90	400+70+50
s6	650	n	300+220+100	340+220	220+120	300	300+110+90	400+70+50
s23	650	n	300+220+100	340+220	220+120+80	n	300+110+90	400+70+50
s31	650	420+220	320+300	240+180+140+120	280+240+100	500+120	200+120+90	200+160+110
s50	650	n	300+220+100	380+240	280+140+100	500+120	300+110+90	450
s51	650	n	300+220+100	380+240	280+140+100	n	300+110+90	450
s52	650	450+240	300+220+100	240+180	260+240	n	450+120	200+160+110
s53	650	n	300+220+100	240+180	240+140+100	n	300+110+90	450
s54	650	n	300+220+100	380+240	240+140+100	n	300+110+90	450
s55	650	450+240	300+220+100	380+240	380+240	550+100	450+120	200+160+110
s32	650	420+220	300+220+100	240+180+140+120	250+220+70	500+120	200+120+90	200+160+110
s42	650	400+220	300+220	220+180	350+220	520	400+120+90	200+160+110
s43	650	400+220	300+220	370+240	350+220+120+100	n	300+110+90	450
s27	650	420+220	300+220+100	220+180	150+120+80+60	500+120	300+110+90	450

**Tab. 5:** Souhrnná tabulka délky restričních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA typových kvasinek rodu *Pichia*.

číslo	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
s7	450	300+80+60	220+100+80	200+160+50	250+200	240+150	320+90+60	180+100+50
s25	450	350+80	180+100+80	360+200	250+200	240+150	290	n
s33	450	350+80	180+100+80	200+160+50	250+200	240+150	290	n
s34	650	n	280+60	320+200	310+200+140	n	n	240+140+120
s37	650	n	280+60	320+200	320+300+180+120	n	n	240+140+120
s44	600	400+120+80	300+260	250+180+160	310+290	380+160	n	400+100

**Tab. 6:** Souhrnná tabulka délky restričních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA typových kvasinek rodu *Hanseniaspora*.

číslo	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
s16	750	n	320+100	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	300+140+100+80
s17	750	n	320+100	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	300+140+100+80
s18	750	n	320+100	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	300+140+100
s19	750	n	320+100	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	300+140+100
s20	750	n	320+100	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	300+140+100
s21	750	n	320+100	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	300+140+100
s26	750	n	320+100	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	250+120+90+80+50
s28	450	380+70	170+120+80	160+140+120	250+200	n	400+60	350+300+120
s29	750	n	300+180+100+60	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	250+120+90+80+50
s35	450	380+70	170+120+80	160+140+120	250+200	n	400+60	320+280
s36	750	n	320+100	400+180+150	350+200+160+70	n	550+180	250+120+90+80+50
s15	750	n	650+100	400+240	240+220+180+120	n	300+280+190	280+160+80+50
s39	750	450+120+100+80	280+150	410+340	380	n	700	220+200+70
s40	750	n	320+100	300+170+140	350+200+160+70	n	500+150	260+120

**Tab. 7:** Souhrnná tabulka délky restričních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA typových kvasinek rodu *Saccharomyces*.

číslo	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
s9	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s10	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s11	880	310+240+170+130	220+180+80+60	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s12	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s13	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s14	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s45	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s46	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s47	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s48	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s49	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s56	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s24	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	240+200+140+100
s8	900	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s58	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s59	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s60	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s61	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s62	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90
s63	880	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	700+120	800+80	220+180+120+100+90

**Tab. 8:** Souhrnná tabulka délky restrikčních fragmentů získaných štěpením amplifikované DNA dalších typových kvasinek.

číslo	PCR	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
<b>s30</b>	620	420+130+80	300+220+100	360+220	300+180+220+120+80	300	300+110+90	480+90+60
<b>s38</b>	620	420+130+80	400+220	340+200	280+240+100	300	300+120+90	480+90+60
<b>s57</b>	500	400+100	220+180	300+120	220+180+150	280	350	n

**Příloha 6:** Délky fragmentů získaných na základě analýzy RFLP u vzorků kvasinek izolovaných z vína.

**Tab. 9:** Souhrnná tabulka výsledku štěpení vzorků kvasinek sedmi restričními endonukleázami.

O	PO	AP (bp)	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
Listy	3	750	n	320+110+60	400+180+140+60	340+200+160+70	n	550+180	240+120+90
	11	750	n	320+110+60	400+180+140+60	340+200+160+70	n	550+180	240+120+90
	11'	750	n	320+110+60	400+180+140+60	340+200+160+70	n	550+180	210+180+120+100 +80+50+40
	11"	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+40
	17'''	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20
1. den	10	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20
	4"	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20
	14'	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20
3. den	13	750	n	320+110+60	400+180+140+60	340+200+160+70	n	550+180	240+120+90
	13'	750	n	320+110+60	400+180+140+60	340+200+160+70	n	550+180	240+120+90
	13"	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20
5. den	6	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20
	27'	750	n	320+110+60	400+180+140+60	340+200+160+70	n	550+180	240+120+90
	27"	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20



Tab. 9: Pokračování

O	PO	AP (bp)	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	<i>AluI</i>	<i>MseI</i>
7. den	1'	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
	5"	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
	22"	880	500+240+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
9. den	25	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
	30	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
11. den	23	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
	23'	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
	32	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
13. den	21	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
	21'	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
	24	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
15. den	31	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
	31'	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20
17. den	26	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100+80+50+20

*Tab. 9: Pokračování.*

<b>O</b>	<b>PO</b>	<b>AP (bp)</b>	<b><i>Hae</i>III</b>	<b><i>Hha</i>I</b>	<b><i>Taq</i>I</b>	<b><i>Hinf</i>I</b>	<b><i>Hpa</i>II</b>	<b><i>Alu</i>I</b>	<b><i>Mse</i>I</b>
19. den	28	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20
	29	880	310+240+180+150	380+350+140	300+280+140+100+60	350+120	750+120	800+80	210+180+120+100 +80+50+20