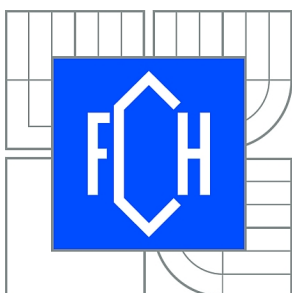




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOLACE, IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE MIKROFLÓRY VÍNA A VYBRANÝCH POTRAVIN

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF MICROBIAL COMMUNITIES OF
WINE AND SELECTED FOODS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. HANA ŠURANSKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0084/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Ing. Hana Šuranská	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (P2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901V021)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	
Konzultanti:	Mgr. Dana Vránová, Ph.D.	

Název dizertační práce:

Izolace, identifikace a charakterizace mikroflóry vína a vybraných potravin

Zadání dizertační práce:

Předložená dizertační práce je zaměřena na izolaci, identifikaci a charakterizaci kvasinek spojených s výrobou jihomoravského vína a s produkcí ručně vyráběných sýrů pocházejících ze zemí západního Balkánu.

Termín odevzdání dizertační práce: 27.1.2014

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

Ing. Hana Šuranská
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2010

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Předložená disertační práce se zabývá mikrobiologií vína a ručně vyráběných sýrů. První část práce je zaměřena na identifikaci kvasinkové mikroflóry izolované z bobulí a moštů během kvasného procesu výroby moravských vín. Jako matrice byly voleny odrůdy bílého (Sauvignon) a červeného (Rulandské modré) vína pocházející z integrované a ekologicky ošetřené vinice. Čisté kultury byly identifikovány molekulární metodou ITS-PCR-RFLP (amplifikující oblast vnitřního přepisovaného mezerníku ITS: ITS1, ITS2 a 5,8S rDNA) za použití tří až sedmi restričních endonukleáz a následně sekvenací ITS oblasti u vybraných izolátů. Z celkového počtu 524 izolátů bylo identifikováno 14 druhů řadící se do šesti rodů. Na začátku se fermentačního procesu účastnily nesaccharomycetní druhy s převahou druhu *Hanseniaspora uvarum*, v pozdějších fázích, díky rostoucí koncentraci alkoholu, byl predominantní druh *Saccharomyces cerevisiae*.

Cílem práce bylo dále zavést postup aplikace selektovaných kmenů *S. cerevisiae* při řízené velkoobjemové výrobě vína. Předpokladem selekce byla v první řadě kmenová identifikace druhu *S. cerevisiae*. Rod *Saccharomyces* byl od ostatních nesaccharomycetních druhů odlišen metodou ITS-PCR-RFLP. Za účelem druhového a následně i kmenového odlišení byla aplikována řada dalších molekulárních metod zahrnujících PCR-fingerprinting (rep- a RAPD-PCR), druhově-specifické primery (multiplexní a touchdownovou PCR), LSU-DGGE a amplifikaci delta oblastí rDNA druhu *S. cerevisiae*. Druhově specifické primery odlišily některé druhy komplexu *Saccharomyces sensu stricto*, amplifikace delta sekvencí za použití primerů $\delta 1$ - $\delta 2$ se ukázala být vhodným nástrojem k odlišení kmenů druhu *S. cerevisiae*. Celkově bylo izolováno 120 kmenů rodu *Saccharomyces*, z toho bylo identifikováno 45 kmenů odlišných. Na základě dobrých technologických vlastností (osmotolerance, alkoholová tolerance, nízká produkce H_2S aj.) byl vybrán autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09 izolovaný z bobulí. Tento kmen byl testován při velkoobjemové fermentaci. Na základě chemické a senzorké analýzy vín byla na závěr posouzena vhodnost kmene pro výrobu vína. Vína připravená inokulací moštu autochtonním kmenem *S. cerevisiae* 1-09 se výrazně nelišila od vín, která byla připravena inokulací moštu komerčně dostupným kmenem.

Další část práce je zaměřena na izolaci, kvantifikaci a identifikaci kvasinek z ručně vyráběných sýrů a jejich meziproductů pocházejících ze zemí západního Balkánu. Izolované druhy byly identifikovány metodou ITS-PCR-RFLP, sekvenací, fyziologickými testy. Mezi dvaceti identifikovanými druhy byly *D. hansenii*, *C. zeylanoides* a *Y. lipolytica* druhy dominantními. Za účelem přímé detekce komplexního mikrobiálního systému zahrnujícího kvasinky a plísně byly aplikovány metody přímé analýzy DNA. Nově zavedená kultivačně nezávislá metoda založená na konstrukci knihovny z metagenomové DNA (ITS genomová knihovna spojená s restriční analýzou) byla srovnána s kultivačně nezávislou LSU-DGGE a taktéž s kultivačně závislou ITS-PCR-RFLP. Odlišnosti mezi metodami byly potvrzeny korelační analýzou a stanovenými indexy biodiverzity a dominance jednotlivých druhů. Tato studie, založená na analýze sekvencí DNA obdržené přímo ze vzorků, vrhá nový pohled na mikrobiální diverzitu a může tak otevírat nové perspektivy přímé komplexní analýzy kvasinek a plísní nejen z potravinových matric, ale i jiných přirozených prostředí.

Klíčová slova

Kvasinky; identifikace; molekulární metody; komplex *Saccharomyces sensu stricto*; víno; sýry a jejich meziproducty; startovací kultura; oenologické vlastnosti.

Proposed dissertation thesis deals with wine and artisanal cheeses microbiology. The first part is focused on identification of yeasts isolated from grapes and musts during production of white and red wines. The grape varieties were grown under the integrated and organic farming on Moravian vineyard. Yeasts were identified by ITS-PCR-RFLP method (amplifying internal transcribed spacer ITS: ITS1, ITS2 and 5.8S rDNA) and unknown species were subjected to partial sequencing of ITS rDNA region. In total, 524 isolates were divided into 14 different species belonging to six genus were identified from. The first stages of fermentation process were characterised by predominance of non-saccharomyces species especially *H. uvarum*. Due to increased ethanol concentration strains of *S. cerevisiae* prevailed in the later phases of the process.

Further, partial aim of this study was to isolate and to apply selected autochthonous *S. cerevisiae* strains as starter culture during controlled industrial wine fermentation process. Genus *Saccharomyces* was distinguished from other non-saccharomyces species by ITS-PCR-RFLP. Further, in order to distinguish *Saccharomyces* genus at the species and the strain level, several molecular methods were applied including PCR-fingerprinting (rep- and RAPD-PCR), species-specific primers (multiplex and touchdown PCR), LSU-DGGE and interdelta PCR. Species-specific primers enabled us to distinguish some species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Furthermore, interdelta PCR seems to be useful tool for *S. cerevisiae* strains identification. Among 120 isolated autochthonous strains belonging to *Saccharomyces* genus, 45 different strains were identified. Based on its sufficient technological properties (osmo- and ethanol tolerance, low H₂S production etc.), *S. cerevisiae* 1-09 strain isolated from grape berries coming from moravian vineyard was chosen. Strain *S. cerevisiae* 1-09 was tested in small amount of must and after that also during industrial fermentation of red and white wine production. Based on the results of chemical and sensorial analysis, the strain seems to be suitable for application as the starter culture for winemaking process.

The final part of this thesis is focused on quantification and identification of the yeasts isolated from artisanal cheeses and their by-products coming from Western Balkan Countries. Isolated species were identified by ITS-PCR-RFLP, partial sequencing and by physiological tests. Among the 20 yeast species found, *D. hansenii*, *C. zeylanoides* and *Y. lipolytica* were found to be predominant. Moreover, we developed culture-independent, semi-quantitative technique based on construction of ITS-clone library from metagenomic DNA to investigate complex fungal communities associated with artisanal cheeses and their by-products. Novel technique is based on direct extraction of total DNA from the sample. This was compared with culture-dependent ITS-PCR-RFLP and culture-independent LSU-DGGE methods. The results highlighted the discrepancies among these methods. Finally, the divergences among applied methods were confirmed by correlation analysis and by indices of general biodiversity and dominance of species. ITS-clone library approach combines the advantages of cultivation-based analysis and LSU-DGGE with semi-quantification of fungal species without the requirement of their cultivation. This study might open new perspectives in direct and complex analysis of yeasts and moulds in food matrices.

Key words

Yeasts; identification; molecular approaches; *Saccharomyces sensu stricto* complex; wine; cheese and their by-products; starter culture; oenological properties.

Šuranská, H.: *Izolace, identifikace a charakterizace mikroflóry vína a vybraných potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 216 s. Vedoucí disertační práce: Doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ:

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

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým vedoucím doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. a Mgr. Daně Vránové, Ph.D. za odborné vedení a veškerou pomoc při řešení dizertační práce.

Dále bych ráda poděkovala kolegům ze sbírky kvasinek CCY Bratislava za spolupráci a taktéž vinařům za poskytnuté vzorky a spolupráci.

Můj velký dík patří taktéž kolegům z Biotechnické fakulty při Univerzitě v Ljubljani, zejména prof. Peteru Rasporovi, který mi umožnil pobyt v jeho laboratoři a doc. Neži Čadež za odborné vedení, lidský přístup a všestrannou pomoc.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem, kteří jakýmkoli způsobem přispěli k realizaci této dizertační práce a svým kolegům a přátelům za podporu a společně strávené chvíle.

Můj velký dík patří taktéž mé rodině za podporu během celého studia a mému příteli za motivaci, podporu a veškerou pomoc.

Motto

„Věda je založena na tom, že příroda odpovídá na inteligentní otázky inteligentně. Pokud neexistuje rozumná odpověď, musí být špatně položená otázka.“

Albert Szent-Györgyi

1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Obecná charakteristika a taxonomie kvasinek.....	13
2.2 Využití kvasinek v potravinářských technologiích	15
2.3 Metody identifikace kvasinek.....	17
2.3.1 Využití rDNA kvasinek k jejich identifikaci	19
2.3.2 Sekvence ribozomálních oblastí	21
2.3.3 Nejčastěji používané molekulární metody určené k identifikaci kvasinek	21
2.3.3.1 <i>PCR-RFLP</i>	21
2.3.3.2 <i>PCR-fingerprinting</i>	22
2.3.3.3 <i>Denaturační/Teplotní gradientová gelová elektroforéza (D/TGGE)</i>	23
2.3.4 Moderní přístupy k identifikaci kvasinek	24
2.4 Biodiverzita a ekologie kvasinek spojená s výrobou vína a sýrů	25
2.4.1 Kvasinky spojené s výrobou vína	25
2.4.1.1 <i>Biodiverzita autochtonních kvasinek na povrchu bobulí</i>	26
2.4.1.2 <i>Druhy kvasinek vyskytující se ve vinném moštu</i>	27
2.4.1.3 <i>Role kvasinek při výrobě vína</i>	30
2.4.1.4 <i>Moderní přístupy v mikrobiologii vína: Produkce startovacích kultur</i>	32
2.4.2 Kvasinky spojené s výrobou sýrů	34
2.4.2.1 <i>Role kvasinek během zrání sýrů</i>	36
2.4.3 Kvasinky jako kontaminanty fermentovaných potravin a nápojů	37
3 CÍLE PRÁCE	41
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	42
4.1 Identifikace kvasinek izolovaných z bobulí a během procesu výroby moravských vín	44
4.1.1 Izolace a identifikace kvasinek z bobulí a fermentovaných moštů z konvenční vinice	45
4.1.1.1 <i>Výskyt autochtonní kvasinkové populace na bobulích a listech</i>	45
4.1.1.2 <i>Monitoring kvasinkové populace v průběhu výroby vína</i>	46
4.1.2 Izolace a identifikace kvasinek z bobulí a fermentovaných moštů z integrované a ekologicky ošetřené vinice	47
4.1.2.1 <i>Výskyt autochtonní kvasinkové populace na bobulích</i>	48
4.1.2.2 <i>Výskyt kvasinkové populace v průběhu kvasného procesu výroby vína</i>	49
4.1.2.3 <i>Kvantifikace populace kvasinek v průběhu výroby vín</i>	53
4.1.2.4 <i>Přímá analýza kvasinkové populace</i>	55
4.2 Identifikace, testování, výběr a použití autochtonního kmene při výrobě vína	56
4.2.1 Druhová a kmenová identifikace sbírkových kmenů rodu <i>Saccharomyces</i>	56
4.2.1.1 <i>PCR-RFLP</i>	58
4.2.1.2 <i>PCR-fingerprinting</i>	60
4.2.1.3 <i>Druhově specifické primery (Multiplexní a touchdownová PCR)</i>	62
4.2.1.4 <i>LSU-DGGE</i>	63

4.2.1.5	<i>Interdelta polymorfismus – kmenová identifikace S. cerevisiae</i>	64
4.2.1.6	<i>Souhrn a zhodnocení aplikovaných identifikačních technik</i>	65
4.2.2	Identifikace izolovaných kmenů <i>S. cerevisiae</i>	69
4.2.3	Screening oenologických vlastností vybraných izolovaných kmenů <i>S. cerevisiae</i>	71
4.2.4	Testování autochtonního kmene ve vinařství – identifikace kvasinek v řízeném procesu fermentace, stanovení základních chemických parametrů a sensorické zhodnocení výsledných produktů ..	78
4.2.4.1	<i>Monitoring kvasinkové mikroflóry v průběhu řízeného kvašení</i>	78
4.2.4.2	<i>Stanovení základních chemických parametrů – posouzení průběhu fermentačního procesu</i>	82
4.2.4.3	Senzorické zhodnocení finálních produktů	86
4.3	Identifikace kvasinek izolovaných z ručně vyráběných sýrů	89
4.3.1	Genotypová a fenotypová identifikace přirozeně se vyskytujících kvasinek v sýrech.....	92
4.3.2	Zavedení přímé semi-kvantitativní identifikační metody	97
5	ZÁVĚRY	103
6	SOUHRN	105
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	107
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	122
9	SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	1223
10	SEZNAM PŘÍLOH	126

Kvalita fermentovaných potravin a nápojů, na kterou je v posledních letech kladen důraz, je z velké části ovlivněna mikroorganismy použitými při jejich přípravě. Jednou z těchto skupin mikroorganismů jsou kvasinky, které hrají důležitou úlohu při produkci fermentovaných potravin a nápojů, jako je např. víno, pivo, sýry aj. (Kurtzman et al., 2011).

Použití kvasinek, stejně jako dlouhá historie výroby vína, sahá několik tisíc let zpátky. „Moderní“ základ produkce vína položil Pasteur a jeho následovníci, kteří poukázali na nezastupitelnou roli mikroorganismů, především kvasinek, při jeho výrobě. I po tolika letech je víno z hlediska mikrobiologie velmi atraktivní a v současné době stále hojně studované téma. Pozornost vědecké komunity je upřena na charakterizaci vína z hlediska kvasinkové mikroflóry, která je nedílnou součástí jeho přípravy. Metabolické aktivity ať už saccharomycetních, tak i nesaccharomycetních druhů totiž vedou a ve výsledku ovlivňují senzorický profil vína (Fleet, 2003; Jolly et al., 2006). Další oblastí, kde kvasinky pozitivně přispívají k organoleptickým vlastnostem produktu, je produkce sýrů. Díky svým specifickým enzymatickým aktivitám ovlivňují průběh jejich zrání a některé druhy (stejně jako při výrobě vína) bývají používány i jako startovací kultury (Irlinger a Mounier, 2009).

Obecně platí, že k porozumění příspěvku kvasinek k danému produktu, je nezbytné znát zásadní charakteristiky, jako jsou (i) taxonomické zařazení každého druhu spojeného s procesem; (ii) kinetika růstu; (iii) vybrané biochemické aktivity a v neposlední řadě (iv) vliv mikrobiálního působení na kvalitu finálního produktu (Fleet, 2001). Kontrola složení kvasinkové mikroflóry může předejít možné nežádoucí kontaminaci během výroby potravin a nápojů. Proto je izolace, identifikace a charakterizace kvasinek důležitá, zejména pak ve spojení s produkcí kvalitních potravin a alkoholických nápojů. Současně izolace a identifikace kvasinek během spontánní fermentace umožňuje aplikaci autochtonních kmenů jakožto startovacích kultur. Použití těchto kmenů v procesu výroby vína pomáhá zachovávat regionální charakter a potlačuje uniformitu spojenou s aplikací komerčně dostupných kmenů (Capozzi a Spano, 2011; Tristezza et al., 2012; di Maio et al., 2012).

Identifikace kvasinek izolovaných v průběhu výroby potravin a nápojů (v našem případě se jedná o víno a sýry) je v současnosti spojena s aplikací novějších metod. Tyto metody jsou založeny na molekulární typizaci a jsou spojeny s polymerázovou řetězovou reakcí. Aplikací metod, jako je např. PCR-RFLP (stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů amplifikované vybrané oblasti rDNA) můžeme docílit relativně rychlou, snadno opakovatelnou a reprodukovatelnou identifikaci většího množství izolátů. Dlouhodobé problémy spojené s druhovou a kmenovou identifikací kvasinek spadajících do komplexu *Saccharomyces sensu stricto*, který zahrnuje kmeny spojované s fermentací vinného moštu, vedl k aplikaci dalších technik, jako je např. PCR-fingerprinting, amplifikace delta sekvencí, sekvenace určitých oblastí rDNA apod.

Na druhou stranu novější studie ukazují, že ekologie fermentovaných potravin nemůže být efektivně studována pouze za použití metod, které vyžadují izolaci a kultivaci mikroorganismů před samotnou identifikací. V současné době se výzkum taktéž opírá o přímou izolaci a detekci mikrobiální DNA v daném vzorku bez předchozí kultivace mikroorganismů (např. metoda DGGE, TGGE apod.). Využití přímé identifikace umožňuje relativně rychlou detekci mikrobiálních systémů, čehož je v současné době hojně využíváno (Cocolin et al., 2000; Coppola et al., 2008; Jany a Barbier, 2008; Prakitchaiwattana et al., 2004).

2.1 Obecná charakteristika a taxonomie kvasinek

Kvasinky obecně představují skupinu jednobuněčných askomycetních nebo basidiomycetních vláknitých hub (lat. *Fungi*) rozmnožujících se vegetativně pučením, dělením nebo pohlavně (Boekhout a Robert, 2003). Pododdělení kvasinek, která jsou založena na aspektech pohlavního rozmnožování (*Ascomycotina*, *Basidiomycotina*), jsou uvedena v **tab. 1**. Existuje taktéž skupina kvasinek, u kterých nebylo prokázáno pohlavní rozmnožování (*Deuteromycotina*). Kvasinky se hojně vyskytují v přírodním prostředí, nejčastěji na cukerných substrátech (Walker, 1998; Boekhout a Robert, 2003).

Taxonomie obecně patří k nejstarším biologickým vědám. Počátky taxonomie kvasinek byly velmi jednoduché – kvasinky byly známé jako mikroorganismy schopné zkvašovat cukerné substráty. První taxonomii kvasinek vydal v roce 1895 dánský vědec E. Ch. Hansen. Od tohoto roku se taxonomie kvasinek rozvíjela, byla vydána řada publikací. Od 30. let minulého století byly výsledky postupně publikovány v odborné publikaci „*The yeasts a taxonomic study*“. Tato publikace je vydávána dodnes zhruba v desetiletých intervalech, kdy počet druhů kvasinek i autorů zabývajících se taxonomií roste. V dnešní době je popsáno asi 150 rodů a více než 1500 druhů kvasinek. Počet rodů a druhů kvasinek postupně popsány v monografiích je uveden v **tab. 2** (Janderová a Bendová, 1999; Deák, 2008; Kurtzman et al., 2011; Deák a Péter, 2013).

Taxonomie je založena na morfologických, fyziologických a v dnešní době čím dál více využívaných genetických charakteristikách. Pravidla taxonomie kvasinek a vláknitých hub obecně spadá pod pravomoc „*International Code of Botanical Nomenclature (ICN)*“ (Greuter et al., 1994). Identifikace kvasinek je v biotechnologiích velmi důležitá. Jako příklad je možné uvést nutnost odlišení ušlechtilých a divokých kvasinek během různých průmyslových procesů, jako je např. výroba vína, kdy některé kmeny kvasinek mohou mít potenciální nežádoucí vliv na kvalitu finálního produktu (Yarrow, 1998; Kurtzman et al., 2011).

Techniky založené na molekulární biologii (genotypové) jsou v dnešní době považovány za alternativní metody k fyziologickým testům (metody fenotypové). Molekulární metody analyzují genom kvasinek nezávisle na fyziologických charakteristikách (Boekhout a Robert, 2003; Fernández-Espinar et al., 2006; Kurtzman et al., 2011). Navíc velkou výhodou molekulárních metod, v porovnání s klasickými konvenčními metodami založenými na fyziologických a morfologických charakteristikách, je snadnější reprodukovatelnost výsledků a časová nenáročnost. Metody molekulární biologie mohou taktéž předcházet chybné identifikaci druhů (Bourdichon et al., 2012). Metody identifikace kvasinek, zejména moderní přístup založený na genetické charakteristice, budou podrobněji popsány v kapitole 2.3.

Tab. 1: Obecný přehled rodů kvasinek a počet zastoupených druhů v rámci příslušného rodu. Rody vyskytující se ve víně a sýrech jsou zvýrazněny (Walker, 1998; Kurtzman a Fell, 1998).

Teleomorfní Askomycetní <i>Ascomycotina</i>	Anamorfní Askomycetní <i>Deuteromycotina</i>	Teleomorfní Basidiomycetní <i>Basidiomycotina</i>	Anamorfní Basidiomycetní <i>Basidiomycotina</i>
Rod (počet druhů)			
<i>Ambrosiozyma</i> (2)	<i>Aciculoconidium</i> (1)	<i>Bulleromyces</i> (1)	<i>Bensingtonia</i> (10)
<i>Arthroascus</i> (4)	<i>Arxula</i> (2)	<i>Chinosphaera</i> (1)	<i>Bullera</i> (14)
<i>Arxiozyma</i> (1)	<i>Brettanomyces</i> (3)	<i>Cystofilobasidium</i> (4)	<i>Cryptococcus</i> (40)
<i>Ascoidea</i> (6)	<i>Candida</i> (152)	<i>Erythrobasidium</i> (1)	<i>Fellomyces</i> (4)
<i>Ashbya</i> (1)	<i>Kloeckera</i> (1)	<i>Filobasidiella</i> (5)	<i>Itersoniella</i> (1)
<i>Botryoascus</i> (1)	<i>Myxozyma</i> (9)	<i>Filobasidium</i> (5)	<i>Kockovaella</i> (2)
<i>Cephaloascus</i> (2)	<i>Oosporidium</i> (1)	<i>Leucosporidium</i> (3)	<i>Kurtzmanomyces</i> (2)
<i>Citeromyces</i> (1)	<i>Saitoella</i> (1)	<i>Kondoa</i> (1)	<i>Malassezia</i> (7)
<i>Clavispora</i> (2)	<i>Schizoblastosporion</i> (2)	<i>Mrakia</i> (4)	<i>Phaffia</i> (1)
<i>Coccidiascus</i> (1)	<i>Sympodiomyces</i> (1)	<i>Rhodosporeidium</i> (9)	<i>Rhodotorula</i> (37)
<i>Cynicomyces</i> (1)	<i>Trigonopsis</i> (1)	<i>Sporidiobolus</i> (3)	<i>Sporobolomyces</i> (27)
<i>Debaryomyces</i> (10)		<i>Sterigmatosporidium</i> (1)	<i>Sterigmatomyces</i> (2)
<i>Dekkera</i> (2)		<i>Tilletiaria</i> (1)	<i>Sympodiomycesopsis</i> (1)
<i>Eremothecium</i> (2)		<i>Tremella a Sirobasidium</i> (12)	<i>Tilletiopsis</i> (6)
<i>Galactomyces</i> (2)		<i>Udeniomyces</i> (3)	<i>Trichosporon</i> (20)
<i>Guilliermondella</i> (1)		<i>Xanthophyllomyces</i> (1)	<i>Tsuchiyaea</i> (1)
<i>Hanseniaspora</i> (6)			
<i>Hansenula</i> (1)			
<i>Hormoascus</i> (3)			
<i>Hyptopichia</i> (1)			
<i>Issatchenkia</i> (4)			
<i>Kluyveromyces</i> (17)			
<i>Lipomyces</i> (5)			
<i>Lodderomyces</i> (1)			
<i>Metschnikowia</i> (10)			
<i>Nadsonia</i> (3)			
<i>Nematospora</i> (1)			
<i>Pachysolen</i> (1)			
<i>Pichia</i> (87)			
<i>Saccharomyces</i> (16)			
<i>Saccharomycodes</i> (2)			
<i>Saccharomycesopsis</i> (6)			
<i>Saturnispora</i> (4)			
<i>Schizosaccharomyces</i> (3)			
<i>Schwanniomyces</i> (3)			
<i>Sporopachydermia</i> (3)			
<i>Stephanoascus</i> (2)			
<i>Torulaspore</i> (3)			
<i>Wickerhamia</i> (1)			
<i>Wickerhamiella</i> (1)			
<i>Williopsis</i> (5)			
<i>Yarrowia</i> (1)			
<i>Zygoascus</i> (1)			
<i>Zygosaccharomyces</i> (9)			
<i>Zygozyma</i> (4)			

Tab. 2: Počet rodů a druhů postupně popsáných v taxonomických monografiích o kvasinkách (Deák, 2008; Deák a Péter, 2013).

Reference	Počet rodů	Počet druhů
Lodder a Kreger-van Rij (1952)	26	164
Lodder (1970)	39	349
Barnett et al. (1983)	63	469
Kreger-van Rij (1984)	60	500
Barnett et al. (1990)	83	597
Kurtzman a Fell (1998)	93	692
Barnett et al. (2000)	93	678
Kurtzman et al. (2011)	148	1500

Izolované, identifikované a charakterizované kmeny kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů izolovaných během procesu výroby potravin a z jiných přirozených prostředí, jsou uloženy ve sbírkách mikroorganismů sídlících zejména na univerzitách nebo ve výzkumných institucích. Jednotlivé sbírky se liší svým zaměřením i počtem uchovávaných druhů a jsou určeny poskytnout materiály a služby vědcům a k podpoře výzkumu na celém světě. V **tab. 3** jsou uvedeny sbírky, které uchovávají a poskytují více než 1000 kmenů kvasinek (Querol a Fleet, 2006).

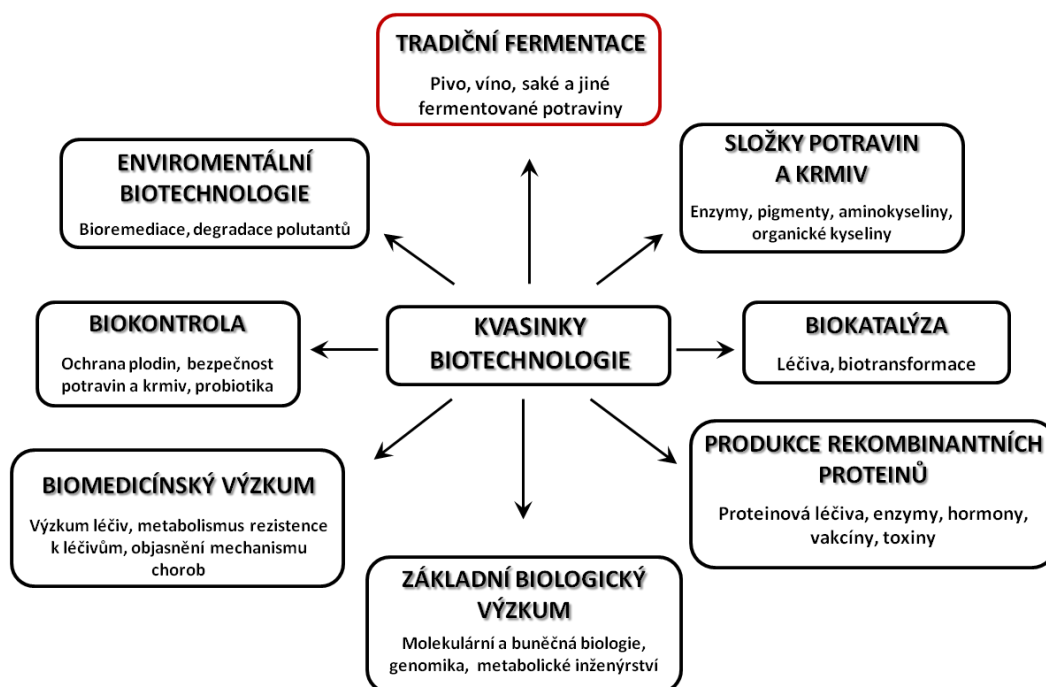
Tab. 3: Sbírký kvasinek (Querol a Fleet, 2006).

Země	Označení sbírky (AKRONYM)
Arménie	RCDM
Belgie	MUCL
Brazílie	CCT
Kanada	LCC
Čína	CGMCC
	YM
Maďarsko	NCAIM
Itálie	DBVPG
Japonsko	IFO
	JCM
Nizozemsko	CBS
Portugalsko	PYCC
Rusko	VKM
Slovensko	CCY
Slovinsko	ZIM
Španělsko	CECT
Taiwan	BCRC
UK	NCYC
USA	ATCC
	NRRL

2.2 Využití kvasinek v potravinářských technologiích

I přes to, že kvasinky jsou velmi malé jednobuněčné organismy (3 – 15 μm), jejich široké využití je známo v celé řadě oblastí vědy a průmyslu. Jedná se například o medicínu (produkce léčiv, enzymů, hormonů, vakcín aj.), produkci rekombinantních proteinů, environmentální biotechnologie zahrnující bioremediace, degradace polutantů aj., dále například při biokontrolě jako ochrana plodin, či v potravinářských technologiích (Walker, 1998; Janderová a Bendová, 1999). Příklady využití kvasinek v biotechnologiích jsou uvedeny souhrnně na **obr. 1**.

Kvasinky mají význam zejména při produkci potravin a fermentovaných nápojů. Vědecké a technologické porozumění jejich rolí během těchto procesů začalo prvotními studiemi Pastera a Hansena, kteří se v průběhu druhé poloviny 19. století ve svých pracích zabývali mikrobiologií fermentačního procesu výroby piva a vína. Ve výzkumu následně pokračovali Guilliermond a Kluyver, kteří konstatovali, že kvasinky představují unikátní skupinu mikroorganismů, jejichž role je při výrobě některých potravin a nápojů nezastupitelná (Fleet, 2006).



Obr. 1: Schematické znázornění různých odvětví využití kvasinek v biotechnologiích (Kurtzman et al., 2011a).

V současné době existuje řada studií zabývajících se kvasinkami a jejich významem při produkci fermentovaných nápojů, potravin či jejich složek a aditiv. V řadě potravinářských technologií (výroba chleba, piva, vína, lihu aj.) se tradičně využívají různé kmeny druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Nicméně v posledních letech narůstá zájem odborné komunity o aplikaci jiných, tzv. nesaccharomycetních kmenů a to zejména ve vinařském průmyslu. Jak Jolly et al. (2003a,b), Ciani a Comitini (2011), Comitini et al. (2011), Benito et al. (2011) a Viana et al. (2008) uvádí, některé druhy rodu *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* mohou mít pozitivní vliv na fermentační proces během výroby vína nebo kvašeného jablečného moštu. Známé je také použití druhu *Schizosaccharomyces pombe* při výrobě rumu (Fahrasmane a Ganou-Parfait, 1998) a druhů rodu *Dekkera* společně se *Saccharomyces pastorianus* a *Saccaromyces cerevisiae* při produkci některých zahraničních piv (Piškur et al., 2012).

Kvasinky hrají také důležitou roli při výrobě mléčných produktů, jako jsou kefír, jogurt aj. Při produkci těchto fermentovaných potravin se používají zejména druhy *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* (Zhou et al., 2009) nebo druh *Saccharomyces boulardii* (Karaolis et al., 2013). V současné době existuje řada studií popisujících důležitou roli kvasinek při produkci sýrů, zejména během jejich zrání a to v důsledku produkce enzymů vykazujících proteolytickou a lipolytickou aktivitu (Corsetti et al., 2001; Golić et al., 2013). Nejvíce zastoupeny bývají zpravidla druhy *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, různé druhy rodu *Pichia* a kvasinkovitý mikroorganismus *Galactomyces geotrichum* (Lavoie et al., 2012).

Díky silné antifungální aktivitě nachází některé druhy kvasinek uplatnění při tzv. biokontrolě znehodnocení potravin. U většiny potravin a alkoholických nápojů představují mikroorganismy komplexní ekosystém, kde kvalitu produktu ovlivňuje diverzita mikrobiálních druhů a jejich interaktivní odezvy. Druhy, jako je například *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guilliermondii*, *Sporidiobolus roseus* nebo *Aureobasidium pullulans* vykazují silnou antagonistickou aktivitu vůči vláknitým houbám a to různými mechanismy účinku, jako jsou produkce killerových toxinů

nebo jiných antimikrobiálních proteinů a peptidů; produkce různých toxických metabolitů (ethanol, acetaldehyd) nebo vzájemné soutěžení o živiny a prostor k růstu (Fleet, 2003b; Schena et al., 2003).

Je taktéž nutno zmínit vzrůstající zájem o probiotickou aktivitu některých kmenů kvasinek, např. *S. cerevisiae* var. *bouardii* nebo *Kl. marxianus* (van der Aa Kuhle et al., 2005; Czerucka et al., 2007; Binetti et al., 2013). Probiotika se obecně řadí mezi široce využívané mikroorganismy při produkci funkčních potravin. Definovány jsou jako živé mikroorganismy, které pokud jsou přítomny v dostatečné koncentraci, jsou zdraví prospěšné a zlepšují složení mikroflóry gastrointestinálního traktu (Ejtahed et al., 2011). Kvasinky s probiotickou aktivitou mohou navíc podporovat i růst bakterií mléčného kvašení (BMK). Probiotika obecně mohou přispívat ke zlepšení zdraví střev a zároveň mohou mít pozitivní vliv při léčbě některých nemocí, jako je např. intolerance k laktóze, alergie aj. (Karaolis et al., 2013).

Působení kvasinek na kvalitu potravin však není pouze pozitivní. Existuje řada druhů, které mohou znehodnocovat potraviny a nápoje, což může mít ve výsledku obrovský dopad na ekonomické ztráty v daném potravinářském odvětví (Loureiro a Querol, 1999; Renouf a Lonvaud-Funel, 2007).

2.3 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 substráty. Kritéria klasifikace byla detailně popsána van der Waltem a Yarrowem v roce 1984 a Kreeger-van Rij v roce 1987 (Fernández et al., 1999; Raineri, 2003; Deák, 2008).

Během posledních dvaceti let nastal značný vývoj metod molekulární biologie. Cílem aplikace nových molekulárních technik, určených k taxonomickému zařazení mikroorganismů, byla zejména eliminace nejasností a možnost zjednodušení identifikace. Jednotlivé molekulární typizační metody jsou charakterizovány podle několika kritérií a ty také určují vhodnost použití dané metody. Mezi základní kritéria, jimiž jsou typizační techniky vzájemně porovnávány, patří **typovatelnost** neboli míra schopnosti poskytnout jednoznačný výsledek pro každý izolovaný druh; **reprodukovatelnost**, tj. pravděpodobnost dosažení téhož výsledku při opakování testu; **rozlišovací účinnost**, která určuje schopnost metody spolehlivě od sebe odlišit jednotlivé izoláty; **snadnost provedení**, jež zohledňuje finanční i pracovní náročnost metody a **snadnost interpretace** získaných výsledků (<http://cepacia.wz.cz>).

V současné době se výzkum opírá o molekulární charakteristiku mikroorganismů. Nově vyvinuté techniky, založené na metodách molekulární biologie, jsou považovány za vhodný nástroj odstraňující dřívější problémy identifikace kvasinek za použití morfologických a fyziologických charakteristik (Deák, 2008; Raineri et al., 2003, Kurtzman a Robnet, 2003a,b). Fenotypové charakteristiky mohou být totiž ovlivněny kultivačními podmínkami a v důsledku toho může dojít k chybné identifikaci (Tornai-Lehoczki, 1996). Fyziologické vlastnosti slouží primárně k popisu a identifikaci kvasinek na úrovni druhu. Pro rutinní identifikaci se používají fermentační testy, testy utilizace a asimilace různých uhlíkatých a dusíkatých zdrojů, požadavek vitaminů, růst v prostředí s vysokým osmotickým tlakem, růst při různých teplotách, rezistence k antibiotikům aj. (Yarrow, 1998; Kurtzman et al., 2011).

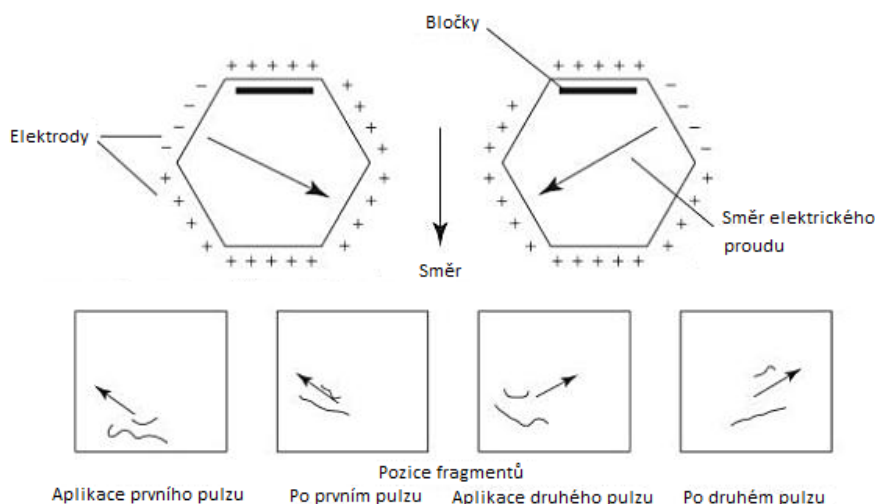
Prvními molekulárními metodami identifikace kvasinek bylo stanovení molárního procentuálního zastoupení guaninu a cytosinu jaderné DNA (% G+C) (Kurtzman et al., 1983; Rapley a Walker, 1998). Metoda byla dříve hojně používána, dosud bylo analyzováno cca 1000 druhů kvasinek, přičemž obsah GC kolísá v rozmezí 27 – 70 %. Obsah GC DNA obvykle odlišuje askomycety od basidiomycet (Kurtzman a Robnett, 1991). U askomycet se obsah GC pohybuje v rozmezí 27 – 50 %, kdežto u basidiomycet mezi 50 – 70 % (Spencer a Spencer, 1997).

Studium a vývoj nových metod pokračovaly a vedly k zavedení metod jako pulzní gelová elektroforéza (PFGE) chromozomální DNA a metod založených na polymerázové řetězové reakci (PCR) (Kurtzman a Robnett, 1991).

Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) je jednou z prvních metod detekce DNA. Metoda se používá k separaci velkých molekul DNA tedy chromozomů (karyotypu) kvasinek (Králová et al., 2001). Při PFGE je DNA dělena podle velikosti a v důsledku schopnosti reorientace DNA v elektrickém poli, jehož směr se pod určitým úhlem v určitých časových intervalech mění (Šmarda et al., 2008). Princip metody je znázorněn na **obr. 2**. V roce 1988 Blondin a Vezhinet a následně v roce 1990 Dubourdiou a Frezier aplikovali tuto techniku k identifikaci oenologických kmenů kvasinek. Vezinhet et al. (1990) ukazuje, že tato metoda je mnohem vhodnější než tehdejší použití restričních profilů mtDNA, které v té době představovalo standardní metodu. Autoři popisují PFGE jako rychlejší a snadnější metodu. Pulzní gelová elektroforéza byla tedy dříve hojně používána k charakterizaci kmenů *S. cerevisiae* (Versavaud et al., 1995). Nelze však opomenout i pozdější aplikaci metody, jakožto metody srovnávací při vývoji dalších jednodušších technik molekulární typizace. Nicméně na druhou stranu literatura uvádí, že se jedná o jednu z technicky nejobtížnějších metod detekce DNA, která za účelem získání interpretovatelných výsledků vyžaduje výbornou praktickou zručnost (Rapley a Walker, 1998). Z toho důvodu byly vyvíjeny další experimentálně méně náročné metody. Nedávný pokrok v molekulární biologii vedl k rozvoji nových molekulárních technik určených k identifikaci kvasinek izolovaných z různých potravinových matric. Tyto molekulární metody jsou často založeny na amplifikaci DNA, k níž se využívá metoda **polymerázové řetězové reakce (PCR)**. V prvním kroku bývá DNA izolována z mikroorganismů. Byla navržena řada protokolů určených k izolaci a purifikaci DNA. V dnešní době se k izolaci používají komerční soupravy, automatická izolace nebo stále ještě tradiční fenol-chloroformová extrakce (White et al., 1990; Kurtzman et al., 2003).

PCR je metoda, která umožňuje exponenciální amplifikaci specifických DNA sekvencí *in vitro* syntézou DNA v programovatelném přístroji (termocykléru). Samotný proces amplifikace se skládá ze tří kroků, které jsou několikrát opakovány. Specifita reakce je primárně dána sekvencí oligonukleotidového primeru, který hybridizuje ke zdenaturované ssDNA. Amplifikovaná DNA je posléze elektroforeticky separována v agarózovém gelu o dané koncentraci a vizualizována pomocí interkalačního barviva ethidium bromidu (Querol a Barrio, 1990; Kurtzman et al., 2003; Fernández-Espinar et al., 2006).

Souhrn metod používaných ke studiu vinných kvasinek je uveden souhrnně v **tab. 4**. Varianty PCR, které jsou nejčastěji používány k typizaci a tedy identifikaci kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů izolovaných z potravin, jsou popsány v textu níže.



Obr. 2: Princip separace molekul DNA pulzní gelovou elektroforézou (Ribéreau-Gayon et al., 2008).

Tab. 4: Souhrn molekulárních metod používaných ke studiu vinných kvasinek.

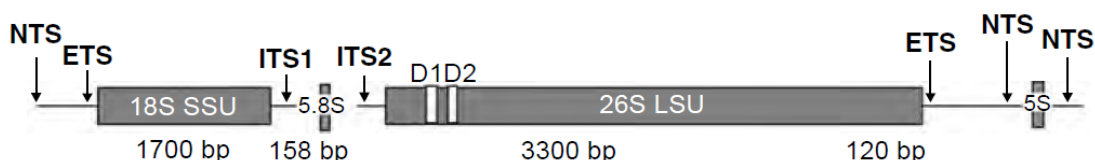
Metoda	Zdroj
RFLP	Vezinhet et al. (1990)
+ sondy	Querol et al. (1992)
mtDNA	Guillamón et al. (1996)
PFGE	Tornai-Lehoczki a Dlauchy (1996)
PCR-fingerprinting	Lavallé et al. (1994)
Mikrosatelitní primery	Gallengo et al. (1998)
Delta-transposony	Fernández-Espinar et al. (2001)
RAPD	Quesada a Cenis (1995)
PCR-RFLP	Valente et al. (1996)
ITS1-ITS2-RFLP	Esteve-Zarzoso et al. (1999)
ITS2-RFLP	Fernández et al. (2000)
NTS-RFLP	Caruso et al. (2002)
18S-RFLP	Capece et al. (2003)
AFLP	de Barros Lopes et al. (1999)
Nested PCR	Ibeas et al. (1996)
Multiplexní PCR	López et al. (2003)
Druhově specifická PCR – rod <i>Saccharomyces</i>	Muir et al. (2011)
PCR-DGGE	Cocolin et al. (2000)
PCR-TGGE	Manzano et al. (2005)
FISH	Stender et al. (2001)
DNA čipy	Perez-Ortin et al. (2002)

2.3.1 Využití rDNA kvasinek k jejich identifikaci

Skutečnost, že rDNA je vysoce konzervativní a obsahuje určité segmenty specifické pro dané druhy, otevírá řadu aplikací využití rDNA v taxonomii a fylogenezi (Valente et al., 1999).

rDNA kvasinek (**obr. 3**) se skládá z konzervativních a proměnných oblastí, které jsou uspořádané v tandemově se opakujících několika stech kopiích na genom. Konzervativní sekvence se nacházejí především v genech kódujících malé 18S, 5.8S, 5S a velké (25 – 28S) podjednotky rRNA. V rámci každého klastru se mezi podjednotkami vyskytují tzv. proměnné mezerníkové oblasti nazývané vnitřní přepisovaný mezerník (ITS oblasti). Struktura každého genového klastru je pak obvykle následující: 5' ETS (ETS, vnější přepisovaný mezerník), 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA

3' ETS. Jednotlivé genové klastry jsou pak odděleny intergenovými mezerníky (IGS), nebo oblastí zvanou nepřepisovaný mezerník (NTS). Všechny tyto oblasti mají potenciál pro rodové a druhové odlišení. Výzkum je zaměřen zejména na oblast 18S (SSU), 26S (LSU) a ITS (Kurtzman a Robnett, 1998; Esteve-Zarzoso et al., 1999). Oblast 18S rDNA se ukázala být vhodnou k prvotnímu odlišení mezi skupinami kvasinek – je dobrá k rodové a druhové identifikaci (Bekhout a Robert, 2003; Hocking et al., 2006).



Obr. 3: Schematické znázornění struktury opakující se jednotky kvasinkové rDNA (Querol a Fleet, 2006).

Doména D1/D2 velké podjednotky 26S rDNA (LSU) se skládá zhruba z 600-ti nukleotidů a může být sekvenována pro prakticky všechny známé druhy kvasinek. Oblast D1/D2 LSU rDNA bývá používána při rutinní identifikaci kvasinek a fylogenetické taxonomii. Srovnání sekvencí může být taktéž použito pro malé podjednotky 18S rDNA, avšak databáze nejsou tak obsáhlé a sekvenční rozdíly nemusí být dostačující, aby umožnily odlišení blízce příbuzných druhů (Daniel a Mayer, 2003). Touto cestou je nemožné odlišit druhy komplexu *Saccharomyces sensu stricto* (kap. 2.4.1.2). Gen 5,8S má vysoce konzervativní sekvence vykazující malou variabilitu, která není dostatečná pro odlišení podobných kmenů (Chang et al., 2007).

Oblasti ITS rDNA (ITS1, ITS2 a 5,8S) vykazují vyšší míru divergence než domény D1/D2 LSU rDNA a proto se tyto oblasti ukázaly být vhodné spíše pro druhové odlišení. Fakt, že jsou to právě oblasti ITS, které jsou často využívány k identifikaci a taxonomickému zařazení kvasinek, je zapříčiněn jednak tím, že jsou díky velkému počtu kopií na genom snadno amplifikovatelné a v rámci příbuzných druhů vykazují poměrně vysokou rozdílnost. Tato skutečnost bývá přičítána relativně nízkému evolučnímu tlaku vyvíjenému na tyto nekódující sekvence. Takže použití ITS oblasti může poskytnout požadovanou míru odlišení (Naumov, 2000).

Velikost ITS amplikonů se může lišit v závislosti na druhu. Proto mohou být druhy rozlišeny více méně v závislosti na velikosti polymorfizmů jednotlivých amplikonů. V porovnání s oblastí 18S rDNA právě oblast ITS rDNA vykazuje vyšší stupeň odlišení (Boekhout a Robert, 2003). V případě identifikace mohou nekódující ITS oblasti umožnit identifikaci na úrovni rodu a druhu. V mnohých studiích je použití ITS rDNA kombinováno s restriční analýzou PCR produktů – metoda ITS-PCR-RFLP. V této kombinaci metod se nejprve specifický fragment DNA amplifikuje pomocí PCR a amplikony jsou následně štěpeny působením specifických restričních endonukleáz (Dendis et al., 2003; Llanos-Frutos et al., 2004; Guillamon et al., 1998). Princip metody a její potenciální aplikace pro identifikaci kvasinek bude popsán níže.

Oblast IGS rDNA může být taktéž použita k identifikaci kvasinek. Amplifikací celé oblasti IGS specifickými primery a následnou restriční analýzou je možné od sebe odlišit jednotlivé kmeny *S. cerevisiae* (Baleiras Couto et al., 1996).

Sekvence mitochondriálních genů a genů kódujících proteiny jsou taktéž používány ke stanovení fylogenetických vztahů mezi kvasinkami. V literatuře jsou uváděny geny kódující translační elongační faktor 1 α , aktin-1, RNA polymerázu II, pyruvát dekarboxylázu, β -tubulin gen, malé podjednotky rDNA a cytochrom oxidázu II (Daniel a Mayer, 2003).

2.3.2 Sekvence ribozomálních oblastí

Určení sekvencí rDNA je v dnešní době důležitou charakteristikou používanou při identifikaci, taxonomii a fylogenetických studiích. Výhody rDNA jsou ty, že je přítomna ve všech živých mikroorganismech, má společný evolučně daný původ, v genomu se vyskytuje v mnoha kopiích a vlastní konzervativní a variabilní oblasti (Kurtzman, 2006).

Metoda je založena na stanovení a srovnání nukleotidových sekvencí amplifikovaných určitých oblastí kvasinkové rDNA. Nejčastěji sekvenovaná oblast je oblast D1/D2 lokalizovaná na 5´konci genu 26S (LSU) (Kurtzman a Robnett, 1998) a gen 18S (James et al., 1997). V dnešní době se taktéž sekvenuje oblast 5,8S ITS a oblast ITS (5,8S ITS + D1/D2 ITS rDNA) (Čadež et al., 2003; Golić et al., 2013). Dostupnost těchto sekvencí v databázích, zejména pak v případě oblasti D1/D2 LSU rDNA, dělá tuto metodu velmi užitečnou k přiřazení neznámých identifikovaných kvasinek k určitému druhu na základě procentuální homologie jejich sekvencí (Kurtzman a Robnett, 1998). Databáze jsou dostupné online na <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> a přístup k datům i jejich analýze jsou možné prostřednictvím služby BLAST.

Dříve byla molekulární sekvenace spojená s klonováním, tedy drahou a časově náročnou metodou. Nyní je metoda považována za běžnou rutinní analýzu v molekulárních studiích a to díky tomu, že lze využít i přímé sekvenace PCR amplikonů za použití automatických sekvenátorů. Díky vývoji a zjednodušení sekvenačních technik, které umožňují přímé sekvenování určitých oblastí bez nutnosti klonování, je současná taxonomie běžně založena na analýze DNA sekvencí (Kurtzman a Fell, 2006).

2.3.3 Nejčastěji používané molekulární metody určené k identifikaci kvasinek

2.3.3.1 PCR-RFLP

V roce 1992 a 1993 navrhli Molina et al. k identifikaci kvasinek metodu PCR-RFLP (Jeune et al., 2006). V současné době se jedná o jednu z nejvíce používaných metod rychlé identifikace kvasinek (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Granchi et al., 1999; Hong a Park, 2013).

Pro analýzu kvasinkových druhů je upřednostňovaný segment ITS1-5,8S-ITS2. Použitím vhodných primerů (ITS1-ITS4) může být pomocí PCR tento segment specificky amplifikovaný. PCR produkt je pak za použití specifických restrikčních endonukleáz štěpený a výsledné fragmenty jsou následně děleny v agarózovém gelu pomocí elektroforézy. Velikosti restrikčních fragmentů vzniklých štěpením ITS amplikonu mohou být použity pro druhové odlišení kvasinek. Za účelem jednoznačného odlišení by měla být použita více než jedna restrikční endonukleáza (Boekhout a Robert, 2003; Li et al., 2010).

Metoda ITS-PCR-RFLP má řadu výhod. Patří mezi ně druhová identifikace kvasinek během několika hodin a především finanční nenáročnost. Výsledky jsou obvykle snadno reprodukovatelné a interpretovatelné. Metoda nachází potenciální uplatnění v potravinářském průmyslu a to především k zjišťování kvality potravin a nápojů. Guillamón et al. (1998) použili restrikční analýzu oblasti ITS 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 (Querol a Fleet, 2006; Le Jeune et al., 2006; Heraz-Vazquez et al., 2003; Čadež et al., 2002; Granchi et al., 1999). Jak již bylo dříve zmíněno, rychlé informace o složení kvasinkové mikroflóry během procesu výroby vína totiž pomáhají kontrolovat fermentaci a docílit tak vysoké kvality požadovaného produktu (Capece et al., 2003).

2.3.3.2 PCR-fingerprinting

Techniky založené na PCR poskytovaly nové možnosti rozvoje rychlejších a vhodnějších metod typizace kvasinek. Jedny z prvních vyvinutých metod byly **RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) a **AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism). Tyto metody mají schopnost analyzovat rozsáhlou část genomu a odhalují polymorfizmy, které odlišují kvasinky na druhové i kmenové úrovni (van der Vossen et al., 2003).

V případě **RAPD** je templát DNA amplifikovaný jednoduchými krátkými primery velikosti 10 – 15 bp. Jedná se o polymorfismus náhodně amplifikované DNA za použití pouze jednoho oligonukleotidového primeru (Šmarda et al., 2008). Aplikací RAPD získáme tzv. fingerpriny, které jsou kombinací různých počtů amplikonů rozdílné délky a ve výsledku poskytují obraz specifický pro daný druh a kmen (Orbera, 2004; Ergon a Gulay, 2005). Metoda RAPD byla pro vinné kvasinky, zejména rod *Saccharomyces*, zavedena v roce 1995. Výhody metody zahrnují jak jednoduchost provedení, tak rychlost, cenovou dostupnost a potřebu malého množství templátové DNA v porovnání např. s již zmiňovanou PFGE (Molnar et al., 1995).

AFLP je modifikací RAPD. Metoda spočívá v prvotní digesci genomové DNA s jednou nebo dvěma restričními endonukleázami (obvykle *EcoRI* a *MseI*). Fragmenty jsou následně ligovány koncově specifickými oligonukleotidovými adaptory následovanými dvěma po sobě jdoucími cykly selektivní amplifikace pomocí PCR (Orbera, 2004).

Literatura uvádí, že obě metody (jak RAPD, tak AFLP) poskytují dobré výsledky druhové a kmenové identifikace (Orbera, 2004).

Metoda **rep-PCR** využívá **mikro-** a **minisatelity**, což jsou krátké opakující se sekvence kolem 15 – 30 bp a 2 – 10 bp. Podstata metody spočívá v PCR amplifikaci fragmentů DNA oligonukleotidy komplementárními k jednoduché opakující se sekvenci přítomné v cílené DNA. Primery komplementární k sekvencím potom tvoří řadu amplikonů různých délek. V porovnání s RAPD se metoda liší v použití vyšší teploty hybridizace (55 °C × 37°C). Zvýšením teploty se zajistí vyšší specifita hybridizace primeru, což následně zajistí vysokou reprodukovatelnost (Alcoba-Flórez et al., 2007). Často používanými primery při identifikaci vinných kvasinek jsou zejména (GTG)₅, (GAC)₅ a (GTC)₅, (GACA)₅ (dos Santos et al., 2007).

Amplifikace delta sekvencí (tzv. interdelta PCR) je typizační metoda vhodná ke kmenové identifikaci druhu *S. cerevisiae*. Molekulární typizaci kmenů *S. cerevisiae* analýzou interdelta polymorfismu poprvé provedli Ness et al. (1993), kteří navrhli specifické primery $\delta 1$ a $\delta 2$ a ukázali, že delta oblasti jsou stabilní pro tuto techniku. Později Legras a Karst (2003) optimalizovali metodu a zavedli nové dvojice primerů $\delta 12$ - $\delta 21$ a $\delta 12$ - $\delta 2$, jejichž komplementární sekvence jsou lokalizovány v blízkosti hybridizačních míst pro primery $\delta 1$ - $\delta 2$. Genom *S. cerevisiae* obsahuje opakující se DNA sekvence nazývané delta sekvence (300 bp), které jsou rozšířené v genomu (zejména v terminálních chromozomálních oblastech) a jsou často spojené s *Ty1* transposonem. Amplifikace delta oblastí mezi ve výsledku vede k odlišným velikostem kmenově-specifických fragmentů. Jak demonstrují někteří autoři (Schuller et al., 2004; Legras a Karst, 2003) počet lokací těchto elementů má určitou intraspecifickou variabilitu, která může být použita jako genetický fingerprint k identifikaci kmenů *S. cerevisiae*. V rámci molekulárních metod typizace kmenů vinných kvasinek autoři Schuller et al. (2004) uvádějí, že použití mikrosatelitů a interdelta PCR má stejnou míru odlišení jako RFLP mtDNA nebo analýza karyotypů. Autoři došli k závěru, že amplifikace delta sekvencí metodou PCR je velmi vhodná metoda využívaná při kontrole mikroflóry průmyslových fermentací (např. víno). Jedná se totiž o relativně rychlou, reprodukovatelnou a velmi senzitivní metodu (Xufre et al., 2011).

Vývoj nových metod určených k identifikaci kvasinek je stále aktuální téma, řada prací je zaměřena na navrhování nových primerů. Jako příklad můžeme uvést autory Huang at al. (2008), kteří použili nově navržený primer OPT-18 (5'-GATGCCAGAC-3') k odlišení druhu *S. bayanus* od *S. cerevisiae*. Primer poskytuje druhově specifický fragment (974 bp), který byl nalezený u všech testovaných kmenů *S. bayanus* (*S. cerevisiae* tento fragment nemají). Autoři taktéž studií dokazují, že jsou tímto primerem schopni odlišit všech sedm druhů komplexu *Saccharomyces sensu stricto*. Metoda s sebou však nese i značné nevýhody. Jedná se zejména o velmi složitou reprodukovatelnost výsledků. Metoda je velmi citlivá na reakční podmínky, stejně tak jako na kvalitu templátu DNA (Huang at al., 2008). Dále Muir et al. (2011) ve své studii navrhli použití tzv. druhově specifických primerů určených k druhové identifikaci kvasinek spadajících do komplexu *Saccharomyces sensu stricto*.

2.3.3.3 Denaturační/Teplotní gradientová gelová elektroforéza (D/TGGE)

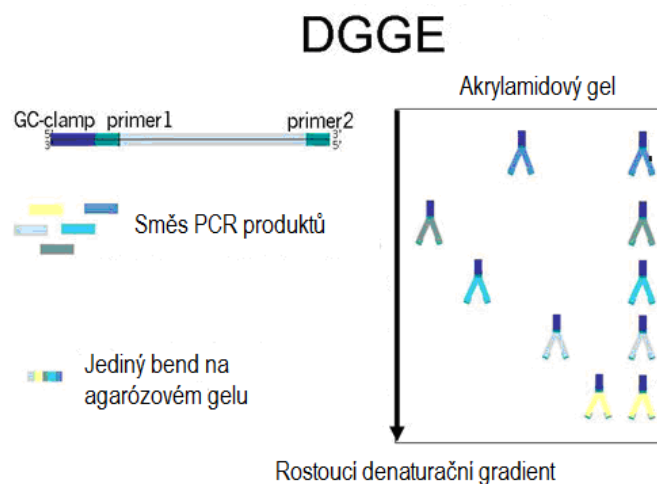
Aplikovaná molekulární mikrobiologie je rychle se vyvíjející oblast. Jedno z odvětví této disciplíny je zahrnuto v rozvoji molekulárních metod za účelem identifikace a monitoringu mikroorganismů v přirozených ekosystémech (Ercolini, 2004).

PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) neboli denaturační gradientová gelová elektroforetická detekce PCR amplikonů je v mikrobiologii potravin používána jen krátce. Metoda nachází v posledních letech své uplatnění v určitých oblastech potravinářské mikrobiologie, jako je např. identifikace mikroorganismů izolovaných z potravin, vyhodnocení mikrobiálního zastoupení fermentačních procesů neboli monitoring rozvoje mikrobiální populace, hodnocení mikrobiologické kvality potravin atd. (Ercolini, 2004; Cocolin et al., 2013). Za účelem monitoringu kvasinkové populace byla metoda uvedena Cocolinem et al. v roce 2000.

DGGE je elektroforetická metoda založená na separaci amplikonů, získaných amplifikací izolované DNA polymerázovou řetězovou reakcí, o stejné velikosti, ale odlišných sekvencích. Fragменты jsou děleny v denaturačním gradientovém gelu díky jejich odlišnému denaturačnímu profilu. V tomto případě se pro separaci používá akrylamidový gel a denaturační podmínky jsou zajištěny roztokem močoviny a formamidu. Nízko a vysoce koncentrované denaturační roztoky, smíchané s roztokem akrylamidu, jsou nalaty do gelové formy za použití gradientového směšovače a to s cílem vytvoření lineárního gradientu denaturačních činidel. Elektroforéza probíhá za konstantní teploty, která je volena v rozmezí 55 – 65 °C, většinou dělení probíhá při teplotě 60 °C. Fragменты dsDNA jsou v DGGE gelu vystaveny rostoucímu denaturačnímu prostředí a to v důsledku zvyšující se koncentrace denaturačního činidla. V důsledku částečné denaturace v daných oblastech dsDNA se vytvoří větvená molekula. Tím tedy dojde ke snížení mobility molekul v akrylamidovém gelu a tudíž k dělení fragментů DNA o stejné velikosti, lišících se v sekvenci nukleotidů. Výsledkem je potom fingerprint obsahující skupinu zón barvitelných ethidium bromidem (Cocolin et al., 2000; Ercolini, 2004). Princip metody je znázorněn na **obr. 4**.

Co se týče amplifikovaných oblastí, tak u kvasinek bývá volena oblast 18S nebo D1/D2 LSU rDNA, která je následně podrobena sekvenaci (Ercolini, 2004).

Alternativou metody je metoda PCR-TGGE (Polymerase Chain Reaction and Temperature Gradient Gel Electrophoresis) neboli teplotní gradientová gelová elektroforéza. Místo rostoucí koncentrace denaturačního činidla se zde využívá denaturace molekul DNA změnou teploty (Ercolini, 2004).



Obr. 4: Schematické znázornění principu metody DGGE (www.intechopen.com).

2.3.4 Moderní přístupy k identifikaci kvasinek

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, populace kvasinek mohou být identifikovány fyziologickými testy nebo molekulárními metodami. Novější studie však ukazují, že ekologie fermentovaných potravin nemůže být efektivně studována pouze použitím výše jmenovaných metod, které vyžadují izolaci a kultivaci mikroorganismů před samotnou identifikací. Během posledních deseti let byla tedy pozornost upřena na přímou detekci mikrobiální DNA (Cocolin et al., 2000; Coppola et al., 2008; Jany a Barbier, 2008; Prakitchaiwattana et al., 2004).

V dnešní době se molekulární metody, určené k identifikaci a detekci mikroorganismů v potravinách a jiných maticích, dají rozdělit na dvě velké skupiny a to na metody, které jsou závislé na předchozí kultivaci mikroorganismů (např. ITS-PCR-RFLP, PCR-fingerprinting aj.) a na metody přímé detekce neboli přímé analýzy DNA bez předchozí kultivace mikroorganismů. Jedná se např. o metody PCR-DGGE, PCR v reálném čase (qPCR), fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) nebo relativně novou metodu denaturační vysokotlaké kapalinové chromatografie (D-HPLC) (Bonetta et al., 2008; Quigley et al., 2011; Cocolin et al., 2013; Delavenne et al., 2011).

Metody závislé na kultivaci totiž s sebou nesou řadu nevýhod. Ne všechny mikroorganismy jsou kultivovatelné, některé pro svůj růst vyžadují specifické podmínky (Quigley et al., 2011; Ndoye et al., 2011). Jany a Barbier (2008) taktéž uvádí, že druhy vyskytující se v nízké koncentraci nejsou schopny soutěžit s početně více zastoupenými druhy. V dnešní době jsou tedy čím dál více upřednostňovány metody založené na přímé analýze DNA. Tyto metody, spojené s polymerázovou řetězovou reakcí, nabízejí vědcům možnost studia ekologie komplexních mikrobiálních ekosystémů (Bonetta et al., 2008; Quigley et al., 2011). Mikroorganismy jsou často studovány ne díky jejich schopnosti růst na specifických kultivačních médiích, ale protože obsahují DNA a RNA, díky nimž jsou identifikovány. Metody přímé detekce mikroorganismů s sebou nesou řadu výhod (Cocolin et al., 2013). Jedná se zejména o časovou nenáročnost ve srovnání s fyziologickými a molekulárními metodami. Navíc buňky nejsou kultivovány, a proto odpadá riziko zkreslení dat spojených s použitím kultivačních médií (např. ztráta některých kmenů při ředění; některé mikroorganismy jsou rychle rostoucí, jiné preferují pro svůj růst specifické podmínky apod.). Na druhou stranu i přes to, že existuje řada výhod v porovnání s kultivačně závislými technikami, metody nezávislé na kultivaci s sebou nesou limitace, jako je například obtížnost kvantifikace buněk (např. při PCR-T/DGGE) nebo paralelní detekce

mrtvých buněk. Další nevýhody těchto metod jsou spojeny s PCR, kdy senzitivita PCR je často snižována přítomností široké škály inhibitorů. Velmi důležitým krokem je tedy krok optimalizace izolace DNA (Quigley et al., 2011; Jany a Barbier, 2008). Nedostatky v PCR jsou taktéž přičítány odlišnostem v účinnosti amplifikace templátové DNA nebo inhibice amplifikace tzv. hybridizací nejvíce zastoupených templátů v prvních stádiích amplifikace (Acinas et al., 2005).

Přímé metody jsou v posledních letech tedy často kombinovány s metodami založenými na kultivaci mikroorganismů. Současné využití obou přístupů může být použito k popisu příspěvku jednotlivých mikroorganismů, kdy můžeme identifikovat druhy dané komunity, vyhodnotit jejich zastoupení a analyzovat dynamiku dominantních druhů (Ndoye et al., 2011).

2.4 Biodiverzita a ekologie kvasinek spojená s výrobou vína a sýrů

2.4.1 Kvasinky spojené s výrobou vína

Produkce vína probíhá ve dvou různých prostředích – na vinici, která představuje přirozený ekosystém ovlivňovaný kultivačními praktikami, a ve vinařství neboli prostředí spojovaném s fermentací, skladováním, zráním vín a lahvováním. Dostupné informace o přítomnosti mikrobiálních komunit na vinohradu, povrchu bobulí a ve vinařství mohou být shrnuty v následujících bodech (Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003):

- (i) zdroj kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů je spojen se všemi částmi vinice, jako jsou půda, vzduch, jiné rostliny a přenašeče
- (ii) hmyz je obecně považován za přenašeče kvasinek
- (iii) diverzita kvasinek kolonizující povrch bobulí je ovlivněna stupněm zralosti bobule
- (iv) výskyt a růst mikroorganismů na povrchu bobulí je ovlivněn jednak srážkami a teplotou, dále pak odrudou a aplikací různých ošetřujících přípravků
- (v) kvasinky jsou lokalizovány zejména na povrchu bobule, kde může unikat z bobule šťáva; vnější část bobule je pak pokryta voskovou vrstvou, která ovlivňuje adhezi mikrobiálních buněk a jejich schopnost kolonizovat povrch bobule
- (vi) oxidativní basidiomycetní kvasinky bez jakéhokoli oenologického významu (*Sporobolomyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp. a *Filobasidium* sp.) jsou na vinici široce rozšířené stejně jako kvasinkovitý mikroorganismus *Aureobasidium pullulans*, který se hojně vyskytuje na nezralých bobulích
- (vii) apikulární kvasinky (*Hanseniaspora* sp. a *Kloeckera* sp.) a oxidativní kvasinky (zejména *Candida* sp., *Pichia* sp. a *Kluyveromyces* sp.) jsou predominantní na zralých bobulích
- (viii) hlavní druh *S. cerevisiae* je prakticky na bobulích nepřítomen (přítomen ve velmi nízké koncentraci) a do procesu fermentace se zapojuje později
- (ix) další druhy (rodu *Pichia* aj.) se do procesu dostávají díky kontaktu vinného moštu s prostředím sklepa

Diverzita rodů/druhů osídlujících povrch bobulí a účastníků se samotného kvasného procesu je popsána v následujících kapitolách.

2.4.1.1 Biodiverzita autochtonních kvasinek na povrchu bobulí

Biodiverzita autochtonních kmenů kvasinek vyskytujících se na povrchu bobulí byla a je monitorována celosvětově na různých vinicích, o čemž svědčí i řada publikovaných prací (Combina et al., 2005; Raspor et al., 2006; Nisiotou a Nychas, 2007; Prakitchaiwattana et al., 2004; Li et al., 2010). Autochtonní kvasinky jsou podle Fleet et al. (2002) definovány jako divoké kmeny, které, pokud jsou použity při fermentaci vinného moštu, mohou produkovat unikátní chuťové látky a přispívat tak k výjimečné kvalitě vína. Diverzita autochtonních kmenů tak přispívá k odlišným vlastnostem vín a tedy k jedinečnému výslednému charakteru daného produktu (Chanprasartsuk et al., 2010).

Obecně lze říci, že složení populace kvasinek je závislé na odrůdě, teplotě, geografických podmínkách, počasí, klimatu, stupni zralosti bobulí v čase sklizně, fyzikálním poškození bobulí a na intenzitě ošetřování. Na nezralých bobulích se kvasinky vyskytují v koncentraci $10 - 10^3$ CFU·g⁻¹. Na druhou stranu na zralých bobulích populace kvasinek dosahuje $10^4 - 10^6$ CFU·g⁻¹ (Fleet et al., 2002).

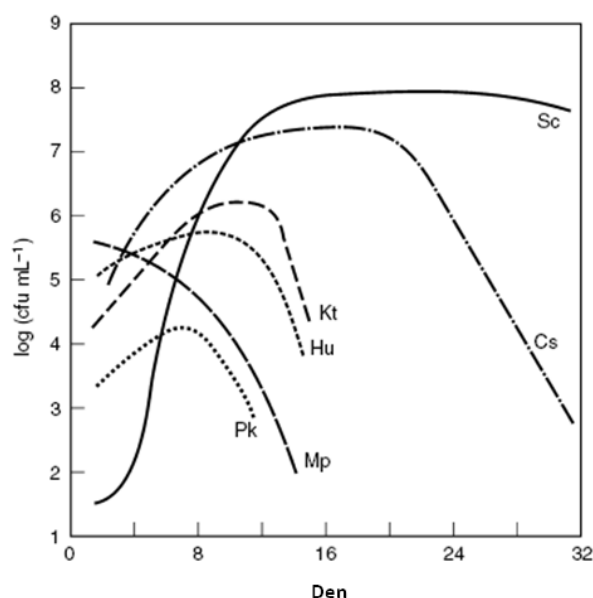
Na povrchu bobulí se zpravidla vyskytuje 9 – 15 kultivovatelných druhů řazených do rodu *Hanseniaspora* sp./*Kloeckera* sp., *Metschnikowia* sp./*Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp. (Rementeria et al., 2003; Jolly et al., 2003a). Nicméně Renouf et al. (2007) uvádí, že použitím přímé analýzy DNA, tedy bez použití kultivačních technik, může být identifikováno až 22 rodů: *Aureobasidium* sp., *Auriculibuller* sp., *Brettanomyces* sp., *Bulleromyces* sp., *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Debaryomyces* sp., *Hanseniaspora* sp., *Issatchenkia* sp., *Kluyveromyces* sp., *Lipomyces* sp., *Metschnikowia* sp., *Pichia* sp., *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces* sp., *Sporidiobolus* sp., *Sporobolomyces* sp., *Torulaspora* sp., *Yarrowia* sp., *Zygoascus* sp. a *Zygosaccharomyces* sp. Někteří autoři taktéž našli druhy rodu *Hansenula* (Longo et al., 1991) a *Saccharomycodes* (Combina et al., 2005).

Nejčastěji však bývají na bobulích nalezeny tři hlavní druhy – *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*) a *Candida stellata*. Z výše uvedených je *H. uvarum* považována za predominantní druh (Bertran et al., 2002; Combina et al., 2005). Zajímavostí je, že v teplejších regionech převládá teleomorfní forma tohoto druhu, tedy *Hanseniaspora uvarum*, kdežto v chladnějších oblastech má tendenci převládat forma anamorfní (*Kloeckera apiculata*). V oblastech s mírným klimatem se obě formy vyskytují ve stejném poměru (Boulton et al., 1996, Jackson, 2008). Na druhou stranu autoři Clemente-Jimenez et al. (2004) a Torija et al. (2001) ve svých pracích uvádí, že na bobulích převažují kvasinky rodu *Candida*. Z bobulí mohou být taktéž izolovány některé basidiomycetní druhy rodu *Cryptococcus* sp., *Rhodotorula* sp. a *Rhodosporium* sp., *Sporobolomyces* sp. (Barata et al., 2012), které jak uvádí Clemente-Jimenez et al. (2004), převažují (co do počtu) nad askomycetami a to zejména v oblastech s chladnějším klimatem. Na bobulích se může vyskytovat i kvasinkovitý mikroorganismus *Aureobasidium pullulans* (široce rozšířený saprofyt ve fylosféře), který je považovaný za potenciálního činitele potlačujícího rozvoj šedé plísně *Botrytis cinerea*. Zajímavostí je, že rod *Saccharomyces* se na povrchu bobulí vyskytuje jen ve velmi nízké koncentraci (zpravidla se uvádí $10 - 100$ CFU·g⁻¹) (Fleet et al., 2002) a v řadě studií zabývajících se identifikací kvasinkové populace nebyl na bobulích detekován (Combina et al., 2005; Raspor et al., 2006).

2.4.1.2 Druhy kvasinek vyskytující se ve vinném moštu

Fermentace vinného moštu je hlavní proces, při kterém kvasinky pozitivně přispívají k chuťové stránce vína (Henschke, 1997) a to hned několika způsoby. Kvasinky využívají složky vinného moštu a produkují ethanol a další organické látky (vyšší alkoholy, estery aj.), které napomáhají extrakci chuťových látek z pevných složek bobulí. Taktéž produkují enzymy, které transformují neutrální složky bobulí na sensoricky aktivní sloučeniny a produkují řadu sekundárních metabolitů, jako jsou například organické kyseliny, alkoholy, estery, polyoly, aldehydy, ketony, těkavé sloučeniny síry (Lambrechts a Pretorius, 2000).

Fermentace vinného moštu může být rozdělena na dva typy. Jedná se buď o přímo inokulovaný mošt za použití komerčních kmenů kvasinek (řízené kvašení) nebo se k procesu kvašení využívá přirozená mikroflóra pocházející z povrchu bobulí. Tento proces se nazývá spontánní kvašení (Bisson, 2004). Populace kvasinek v čerstvém moštu se pohybuje v rozmezí $10^3 - 10^5$ CFU·ml⁻¹. Z toho 50 – 70 % tvoří rod *Hanseniaspora* (*Kloeckera* sp.) (Fleet, 2001).



Obr. 5: Změny populace některých druhů kvasinek během spontánního kvašení. Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Cs: *Candida stellata*, Kt: *Kluyveromyces thermotolerans*, Hu: *Hanseniaspora uvarum*, Mp: *Metschnikowia pulcherrima*, Pk: *Pichia kluyveri* (Mills, 2002).

Postupnou biokonverzi vinného moštu na víno zahajují zejména druhy *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), *Hanseniaspora valbyensis*, *Candida stellata*, *Torulaspora delbrueckii* (*Candida colliculosa*) a *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*) (Schuller et al., 2005). Růst těchto kvasinek je limitován, vyskytují se obvykle během 2 – 4 dnů fermentace. Poté je fermentace převzata a dokončena druhem *S. cerevisiae* (až 10^8 CFU·ml⁻¹). Změny populace některých druhů kvasinek během spontánního kvašení jsou znázorněny na **obr. 5**.

Kvasinky nalezené v moštu lze rozdělit do čtyř hlavních skupin. První tři skupiny zahrnují kvasinky, které nepatří do rodu *Saccharomyces* (tzv. nesaccharomycetní druhy), čtvrtou skupinu druhy rodu *Saccharomyces*:

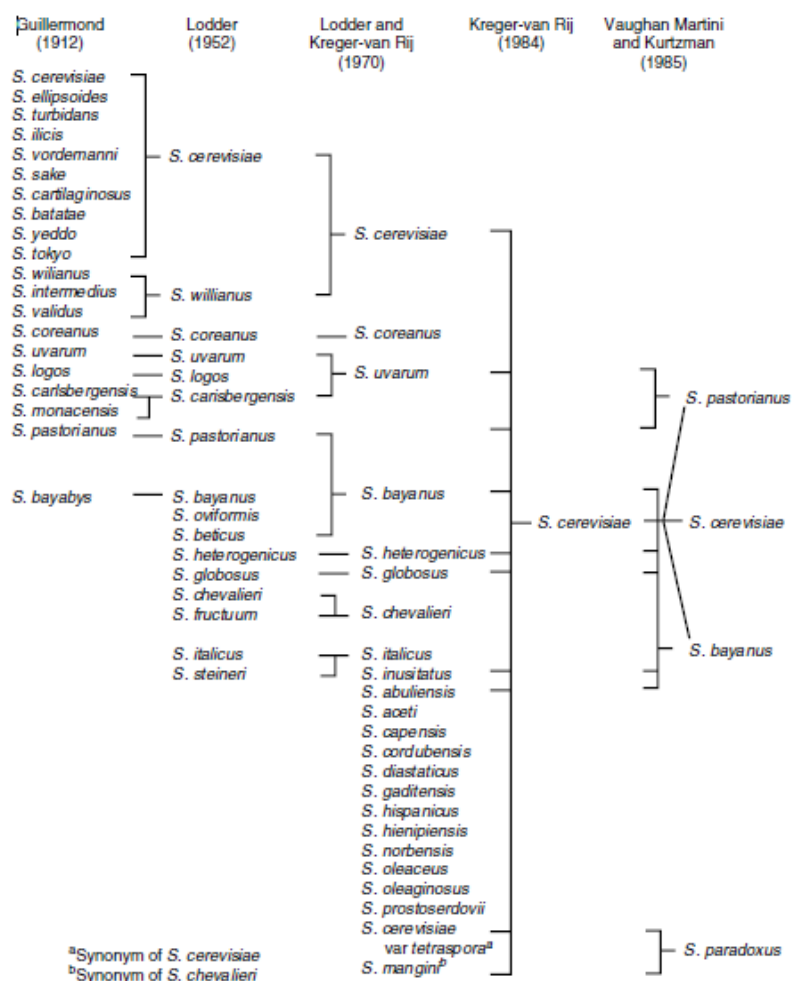
- (i) Kvasinky, které jsou z velké části aerobní (*Pichia* sp., *Debaryomyces* sp., *Rhodotorula* sp., *Candida* sp., *Cryptococcus* sp.).
- (ii) Apikulární druhy s nízkou fermentační aktivitou, tedy schopností metabolizovat sacharidy na alkohol (*K. apiculata*, *H. uvarum*, *K. apis*, *K. javanica*).
- (iii) Kvasinky, které mají střední fermentační aktivitu (*Kl. marxianus*, *Torulasporea* sp., *Zygosaccharomyces* sp.).
- (iv) Druhy a kmeny rodu *Saccharomyces* (Torija et al., 2001; Combina et al., 2005).

Kvasinky rodu *Saccharomyces* hrají hlavní roli při anaerobní přeměně vinného moštu na víno. Díky vysoké toleranci k ethanolu se do procesu zapojují v pozdějších fázích fermentace. 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 s druhem *S. cerevisiae*. Jmenovitě se jedná o druhy *S. dairensis*, *S. castelii*, *S. exiguus*, *S. servazii*, *S. unisporus*, *S. barnetti* a *S. spencerorum*. Komplex *Saccharomyces sensu stricto* je tvořen osmi druhy. Jedná se o kvasinky *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. cariocanus* a nově popsáný druh *S. arboricolus* izolovaný vědci Wang a Bai v roce 2008 z dubové kůry (*Quercus fabri*). Vývoj taxonomie komplexu *Saccharomyces sensu stricto* je znázorněn na **obr. 6**.

Navzdory faktu, že komplex je již delší dobu studovaný, klasifikace není doposud definitivní. Například název druhu *S. cariocanus* byl poprvé navržen v roce 2000 (Naumov et al., 2000), ale některé studie uvádí, že se jedná o tzv. „americkou variantu“ druhu *S. paradoxus* (Liti, 2006; 2009). Nicméně v literatuře je stále uváděn jako druh *S. cariocanus* (Naumov et al., 2010). *S. bayanus* má dvě variety a je stále diskutováno, zda název *S. bayanus* var. *uvarum* by neměl být zpátky přiřazený jeho původnímu druhovému označení *S. uvarum* (Naumova et al., 2005; Rainieri et al., 2006; Scannell et al., 2011).

Druhy *S. cerevisiae*, *S. bayanus* a *S. pastorianus* jsou dlouhá léta spojovány s kvasným průmyslem a pekařstvím. *S. pastorianus* bývá často spojovaný s produkcí piva. Předpokládá se, že se jedná o hybrid *S. cerevisiae* a *S. bayanus* (Rainieri et al., 2003; Rainieri et al., 2006; Nakao et al., 2009; Dunn a Sherlock, 2008). Druh *S. paradoxus* je široce rozšířený v přírodním prostředí, často spojovaný s pryskyřicí na kůře stromů a taktéž bývá izolován z půd (Sniegowski et al., 2002). Další druh *S. kudriavzevii* byl taktéž izolován z kůry stromu a jako hybridní vinařský kmen (Sampaio a Goncalves, 2008; Gognies et al., 2006; Querol a Bond, 2009).

Ekologický a komerční význam těchto kvasinek má za následek, že se často klade požadavek na rychlou identifikaci jednotlivých zástupců komplexu *Saccharomyces sensu stricto* (Makino et al., 2010). Rozlišení a taxonomické zařazení těchto druhů použitím základních morfologických a asimilačních testů je velmi obtížné, a proto jsou za účelem identifikace voleny metody genotypové (kapitola 2.3) (Muir et al., 2011). Možné spektrum molekulárních metod je nyní široce dostupné (Kurtzman, 2006) a každá metoda má své vlastní výhody a nevýhody s ohledem na cíl práce, cenu, dostupné zařízení, rychlost a spolehlivost výsledků. Metody závislé na PCR a sekvenaci jsou nejběžněji používané a díky své spolehlivosti částečně vytlačují fyziologické testy (Úbeda et al., 2009).



Obr. 6: Vývoj taxonomie komplexu *Saccharomyces sensu stricto* (Deák a Beuchat, 1996).

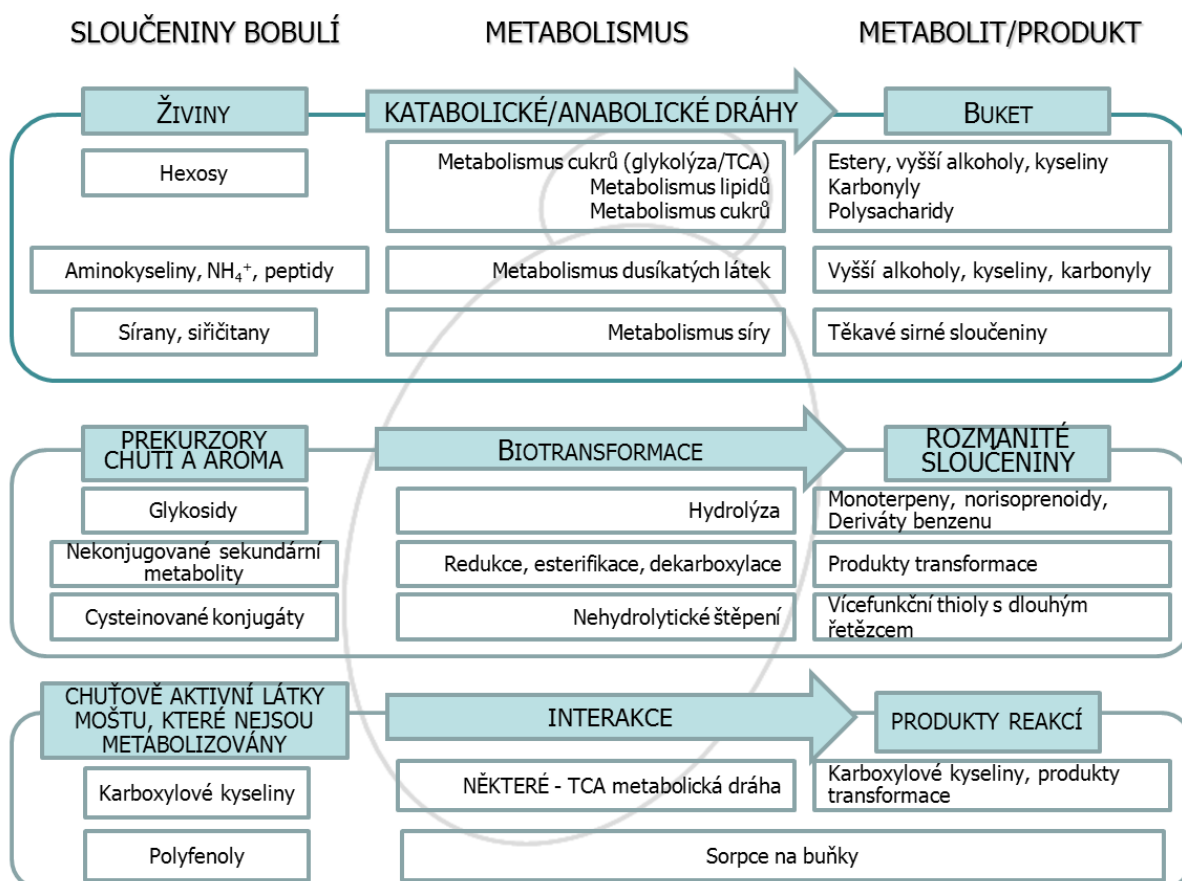
Složení vinného moštu představuje podmínky, které jsou vzdálené od optimálních podmínek vhodných pro většinu mikroorganismů. Kvasinky se musí přizpůsobit nízkému pH (2,9 – 3,8), vysoké osmolaritě (až 300 g·l⁻¹ sacharidů) a zpravidla také vysoké koncentraci SO₂ (40 – 100 mg·l⁻¹). Navíc biologická aktivita kvasinek způsobuje během fermentačního procesu různé stresové podmínky. Jedná se např. o limitaci živinami (např. dusíkem, který je přítomen na začátku fermentace v množství 50 – 600 mg·l⁻¹ a je brzo vyčerpán), měnící se teplotu a toxické prostředí navozené rostoucí koncentrací ethanolu (finální koncentrace 11 – 14 obj %). Vinné kvasinky mají tedy vyvinuté mechanismy, které jim dovolují rozpoznat měnící se podmínky prostředí za účelem udržení integrity buňky a její metabolické aktivity během celého fermentačního procesu (Bauer et al., 2000; Boer et al., 2003; Kwast et al., 2002; Alexandre et al., 2001). Během fermentačního procesu dochází k expresi různých genů kvasinek, jakožto odezva na rozdílné stresové podmínky. Jedná se např. o indukci exprese *pau* genů, které souvisí jednak s tvorbou buněčné stěny a také s adaptací na anaerobní podmínky (Rachidi et al., 2000; Rossignol et al., 2003). Dále může docházet k navýšené expresi genů *rpr*, *rop*, *rps22a*, *rplia*, *rps6b*, které se podílejí na procesu kompletace ribozomů, syntéze proteinů, metabolismu RNA a syntéze nukleotidů (Pizzaro et al., 2007).

2.4.1.3 Role kvasinek při výrobě vína

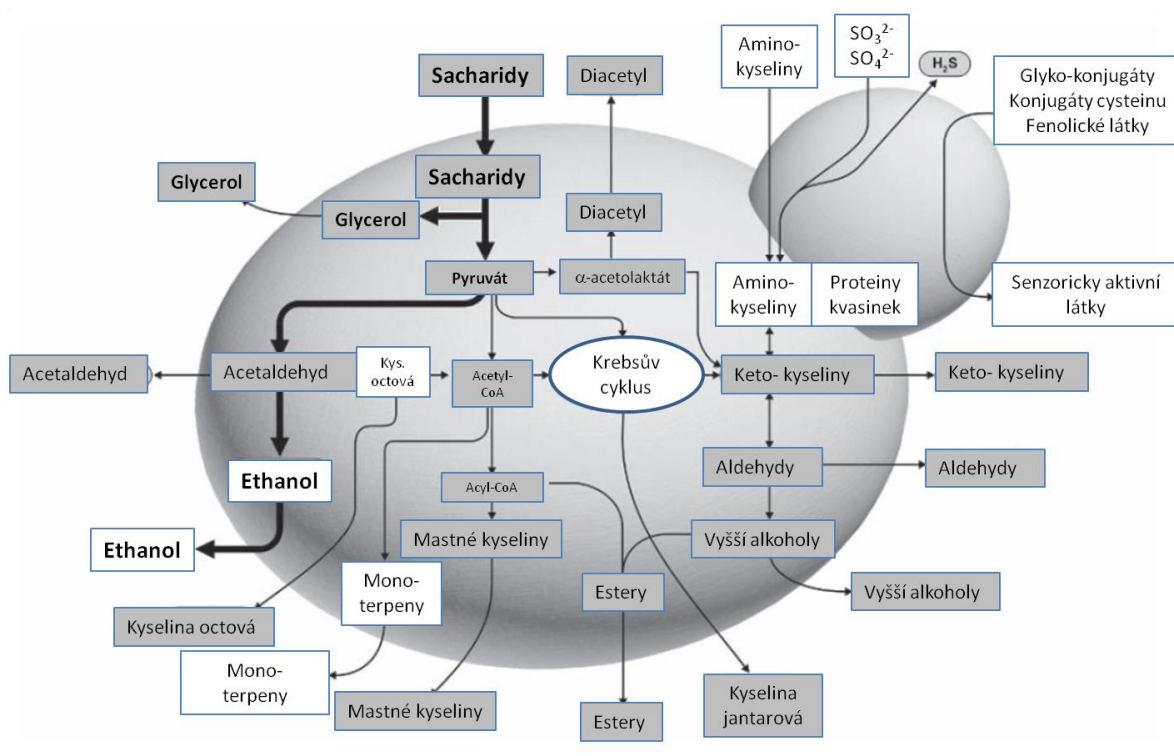
Hlavní charakteristikou procesu výroby vína je konverze sacharidů (zdrojů uhlíku a energie) obsažených v moštu na etanol. Zásadní roli při anaerobní transformaci vinného moštu na víno hraje obecně známý druh *S. cerevisiae*, který celý proces řídí (Bisson, 2004).

Kvasinky obecně využívají složky vinného moštu a následně řídí jejich biotransformaci na aromaticky a chuťově aktivní látky; dále produkují enzymy transformující neutrální složky moštu na chuťově aktivní látky. Kromě etanolu patří mezi metabolity produkované kvasinkami ještě glycerol, kyselina octová a acetaldehyd. Sekundární metabolity jsou pak tvořeny estery, vyššími alkoholy a organickými kyselinami (Styger et al., 2011). Finální sensorická kvalita vína je výsledkem velkého množství interakcí mezi všemi chemickými složkami bobulí/moštu a kvasinkami (**obr. 7**).

Fermentační proces lze obecně rozdělit na tři části: **lag fáze**, ve které musí jednotlivé kmeny kvasinek adaptovat svůj metabolismus na podmínky moštu (např. vysoký obsah sacharidů aj.). V další, tzv. **exponenciální fázi** roste biomasa exponenciálně, je produkována 1/3 ethanolu a hlavní část glycerolu. Poslední **fáze stacionární** je charakteristická tvorbou zbylých 2/3 ethanolu, ale také aromatických látek, které se významně podílejí na kvalitě finálního produktu (Salmon et al., 1998). **Obr. 7 a obr. 8** znázorňují zapojení různých metabolických drah kvasinek podílejících se na tvorbě sensoricky aktivních látek v průběhu fermentace vinného moštu.



Obr. 7: Interakce mezi kvasinkami a složkami bobulí/moštu (Ugliano et al., 2009).



Obr. 8: Schéma derivatizace a syntézy sensoricky aktivních sloučenin ze sacharidů, aminokyselin a metabolismu síry vinnými kvasinkami (Kassemeyer et al., 2009).

V posledních letech je čím dál více věnována pozornost roli kvasinek nepatřících do rodu *Saccharomyces*. Autoři Jolly et al., 2003b a Ciani et al., 2010 ve svých publikacích demonstrují možnost použití směsných kultur (*S. cerevisiae* společně s jinou kvasinkou nespádající do rodu *Saccharomyces*), jakožto startovacích kmenů. Ukazují, že tyto směsné kultury představují snadnou cestu ke zlepšení komplexnosti a zvýšení určité specifické charakteristiky vína.

Dalším zajímavým příkladem použití jiných druhů kvasinek než je druh *S. cerevisiae*, je možnost kontroly nežádoucích mikroorganismů. Existují totiž druhy kvasinek, které mohou v různých fázích fermentace produkovat sloučeniny ovlivňující negativně organoleptický charakter produktu. Je tedy snaha a potřeba eliminovat potenciální kontaminanty během různých fází fermentačního procesu. V tomto případě mohou hrát roli přirozené antimikrobiální látky, které bývají produkovány právě nesaccharomycetními druhy (Ciani et al., 2011).

Význam kvasinek jiných, než je druh *S. cerevisiae* v procesu výroby vína, spočívá zejména v produkci velkého množství rozmanitých sloučenin, které mohou mít zásadní vliv na kvalitu vína (Fleet, 2003). Příklady použití některých druhů jsou uvedeny v **tab. 5**. Taktéž možné synergické interakce mezi odlišnými druhy mohou mít značný vliv na zlepšení finální kvality vína (Mendoza et al., 2007; Fleet, 2008).

Tab. 5: Příklad některých nesaccharomycetních druhů kvasinek a jejich vliv na zlepšení sensorického profilu vín. Kvasinky s nízkou nebo střední fermentační silou bývají zpravidla používány ve směsných kulturách společně s kmenem *S. cerevisiae*.

Druh	Zlepšení	Nevýhody	Citace
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Snížení těkavých kyselin a acetaldehydu Nízká produkce těkavých fenolů Zlepšení aromatického profilu	Střední fermentační síla	Renault et al., 2009
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Malolaktické kvašení Zlepšení kyselosti Stabilita	Produkce H ₂ S a merkaptanů	Volschenk et al., 2003
<i>Pichia quilliermondii</i>	Tvorba pyranoantokyanidů (stabilní pigmenty)	Nízká fermentační síla Vysoká produkce ethylacetátu a kyseliny octové (čistá kultura)	Benito et al., 2011
<i>Pichia anomala</i>	Produkce isoamylacetátu	Nízká fermentační síla Vysoká produkce ethylacetátu a kyseliny octové (čistá kultura)	Rojas et al., 2003
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	Produkce 2-fenylethyl acetátu	Nízká fermentační síla	Viana et al., 2008
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	Produkce 2-fenylethyl acetátu	Nízká fermentační síla	Rojas et al., 2003
<i>Candida stellata</i>	Zesílení produkce glycerolu	Nízká fermentační síla	Soden et al., 2000
<i>Williopsis saturnus (Hansenula saturnus)</i>	Produkce esterů kyseliny octové (izoamylacetát, 2-fenylethylacetát)	Nízká fermentační síla	Lee et al., 2010 Erten et al., 2010

2.4.1.4 Moderní přístupy v mikrobiologii vína: Produkce startovacích kultur

Během posledních třiceti let byla upřena pozornost na ekologii, biochemii, fyziologii a molekulární biologii kvasinek spojovaných s produkcí vína; byl sledovaný vliv kvasinek na chemii vína a na jeho sensorické vlastnosti (Pretorius, 2000; Fleet, 2003, 2007; Swiegers et al., 2005). V posledních letech se producenti snaží uvádět nové typy vín (Fleet, 2008). Pozornost vědecké společnosti je tedy zaměřena na testování a samotnou aplikaci různých kmenů kvasinek (i nesaccharomycetních kmenů) jakožto startovacích kultur. Cílem aplikace vlastních startovacích kultur je dosáhnout charakteristik vína, které by byly odlišitelné od ostatních a potlačit tzv. uniformitu vín zapříčiněnou použitím komerčně dostupných kmenů (Fleet, 2008). Inokulace moštu technologicky charakterizovaným kmenem *S. cerevisiae* nabízí řadu výhod oproti spontánní fermentaci, především možnost proces řídit a kontrolovat. Specifické příspěvky k organoleptické kvalitě vína jsou taktéž ovlivněny vlastnostmi použitého startovacího kmene (González et al., 2012). V posledních letech je tedy mezi producenty vína snaha izolovat kvasinky z vlastních vinic. Jak uvádí Suárez-Lepe a Morata (2012) a Capece et al. (2010), selekce kmenů nabízí novou cestu aplikace kmenů *S. cerevisiae* nebo i jiných oenologických druhů, což ve výsledku může upravit sensorický profil nebo technologické vlastnosti vín.

Proces selekce nových kmenů obvykle začíná izolací většího množství přirozeně se vyskytujících kvasinek z různých substrátů, jako jsou bobule, čerstvý mošt nebo mošt během pozdějších fází spontánní fermentace. Spontánní fermentace je považována stejně jako bobule za dobrý zdroj pro izolaci a selekci nových průmyslových kmenů (Fleet et al., 2002; Fleet, 2008; González et al., 2012). Fleet (2008) popisuje, že původní kmene kvasinek jsou obvykle spojeny s určitou odrůdou

v dané specifické geografické oblasti a díky izolaci těchto kmenů z bobulí a jejich následné aplikaci může být zachován regionální charakter a tzv. terroir místních vín.

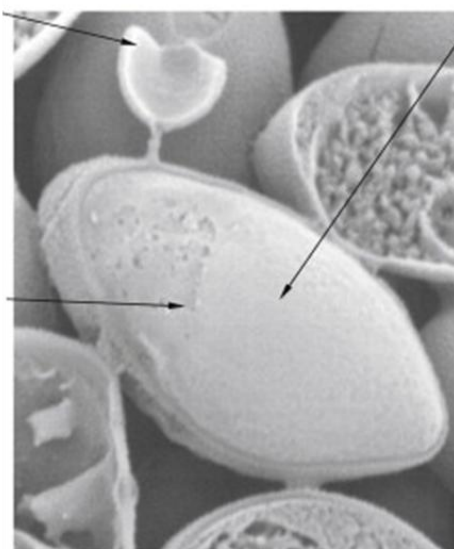
Selektované kmeny, které mají být použity jako startovací kultury, musí mít vhodné oenologické neboli technologické vlastnosti a musí splňovat řadu důležitých kritérií popsanych níže. Kompletní oenologické vlastnosti, které mohou ovlivňovat senzorycké a technologické vlastnosti mohou být rozděleny do tří velkých skupin uvedených na **obr. 9**.

Povrchové vlastnosti

- Osmotolerance
- Adsorpce barviv
- Adsorpce aromát a off-flavouru
- Uvolňování polysacharidů a manoproteinů buněčných stěn
- Flokulační vlastnosti

Fyziologické vlastnosti

- Vysoká fermentační síla
- Vhodná fermentační kinetika při různých teplotách
- Rezistence k SO₂
- Rezistence k fermentačnímu stresu
- Rezistence k mědi
- Nízký požadavek na obsah dusíku v mošttech



Metabolické vlastnosti

- Absence b-glykosidázové aktivity (k úpravě stability barvy u červených vín)
- Produkce b-glykosidázové aktivity (zvýšení aromatického charakteru u bílých vín)
- Zlepšení struktury produkci polyalkoholů (glycerol, 2,3-butandiol)
- Úprava aromatického profilu v důsledku produkce vyšších alkoholů, esterů a jiných metabolitů
- Nízká produkce látek způsobujících off-flavour (metabolismus síry, např. produkce H₂S aj.)
- Nízká produkce toxických metabolitů (methanol)
- Degradace/produkce kyseliny jablečné a octové
- Produkce kyseliny mléčné a sukcinové

Obr. 9: Souhrn kritérií selekce autochtónních kvasinek určených pro komerční použití (Suárez-Lepe a Morata, 2012).

Co se týče zásadních technologických požadavků kladených na kmeny kvasinek, tak prvotním kritériem při výběru kmene je tzv. **fermentační rychlost neboli síla**. Jedná se o sled krátké lag fáze, rychlé fermentace a většinou kompletní spotřeby cukrů přítomných v moštu. Fermentační proces obecně nesmí být příliš dlouhý; musí se předejít vleklé fermentaci. Dobrá fermentační síla je bezpochyby spojená se schopností kmene odolávat stresovým podmínkám, které jsou spojené se všemi fázemi výroby vína. Jedná se o osmotický stres způsobený vysokou koncentrací redukcujících sacharidů a o oxidační stres způsobený nárůstem koncentrace ethanolu, dále pak o rezistenci k SO₂, teplotnímu stresu a nízké požadavky na obsah dusíku v mošttech (González et al., 2012; Suárez-Lepe a Morata, 2012).

Další požadovanou charakteristikou je schopnost produkovat antimikrobiální látky jako jsou **killerové toxiny**. U kmenů *S. cerevisiae* jsou popsány tři formy toxinů a to K1, K2 a K28. Toxiny jsou schopny inhibovat růst kmenů, které neprodukují killerový toxin, anebo které produkují toxin odlišného typu. Výsledkem produkce toxinů je schopnost eliminovat nežádoucí kvasinky a předcházet tak znehodnocení vín (Gulbinieni et al., 2004; Janderová a Bendová, 1999).

Schopnost kmene **flokulovat** je další vlastnost, kterou musí kmen disponovat (Pretorius et al., 2000; Soares, 2010). Je však žádoucí, aby kvasinky setrvaly určitou dobu během procesu kvašení ve stabilní suspenzi a proto příliš silná flokulační vlastnost není vhodná (Ortiz et al., 2013). Navíc, jak uvádí Pretorius (2000) flokulace kvasinek se jeví být spojena s vyšší produkcí esterů.

Co se týče **metabolických aktivit** kvasinek, tak je požadována nízká produkce H₂S, dále degradace/produkce kyseliny jablečné a octové, navýšení produkce polyalkoholů jako je glycerol

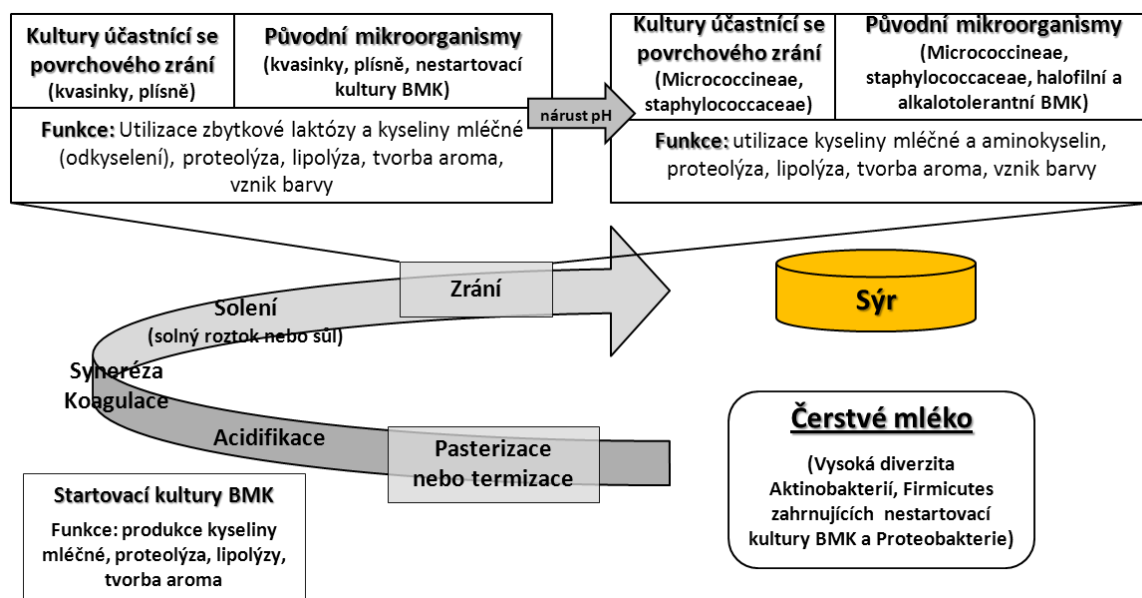
a 2,3-butandiol, které zlepšují výsledný organoleptický charakter vín. Další metabolické aktivity jsou uvedeny na **obr. 9**. Žádoucí jsou taktéž některé enzymatické aktivity (zejména u nesaccharomycetních druhů), kdy enzymová degradace některých strukturních složek bobulí může zlepšit kroky vinifikace, jako je např. extrakce barviv, uvolnění aromatických látek apod. Jedná se především o aktivity: celulázová, β -glukosidázová, glykosidázová, ester-hydrolázová a proteázová (Delcroix et al. 1994; Comitini et al., 2011; Suárez-Lepe a Morata, 2012; Redzepovic et al., 2003).

Souhrnně lze tedy říci, že samotný proces selekce kmenů začíná izolací a získáním čistých kultur většího množství kvasinek rodu *Saccharomyces*, dále pak kmenovou identifikací *S. cerevisiae*, testováním daného kmene na vybrané oenologické vlastnosti a aplikací daného kmene v průmyslu.

2.4.2 Kvasinky spojené s výrobou sýrů

V dnešní době existuje velké množství různých druhů sýrů a výskyt kvasinek, jakožto sekundární mikroflóry, je závislý na typu a původu. V porovnání s vínem je však tento systém z hlediska kvasinkové mikroflóry doposud výrazně méně popsán. V průběhu výroby sýrů se uplatňují především bakterie. Na druhou stranu i přes to, že kvasinky hrají spíše sekundární úlohu, je jejich role zejména během zrání sýrů, nezastupitelná (Addis et al., 2001; Corsetti et al., 2001).

Sýry představují značně heterogenní fyzikálně-chemické prostředí, což umožňuje jejich současnou kolonizaci řadou mikrobiálních druhů, které jsou schopné využít různé uhlíkaté substráty. Mikroflóra sýrů je obecně složena z různých druhů bakterií, plísní a kvasinek. Schematický přehled řady mikroorganismů a funkce odlišných mikrobiálních skupin během výroby sýrů je znázorněn na **obr. 10**. Tyto mikroorganismy zlepšují údržnost a přispívají ke vzniku organoleptického profilu sýrů (Irlinger a Mounier, 2009).



Obr. 10: Schematický přehled řady mikroorganismů a funkce odlišných mikrobiálních skupin během výroby sýrů (Irlinger a Mounier, 2009).

Kvasinky obecně představují důležitou součást kultur účastnících se povrchového zrání sýrů a to zejména díky jejich toleranci k nízkému pH a vodní aktivitě, dále toleranci k vysokým koncentracím solí a nízké teplotě během skladování (Fleet, 1990). Taktéž mají schopnost produkovat lipolytické a proteolytické enzymy a tvořit alkalické metabolity (Corsetti et al., 2001). V sýrech bývají často nalezeny druhy rodů *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* a kvasinkovitý mikroorganismus *Galactomyces geotrichum* (Corsetti et al., 2001). Nejvíce zastoupeny jsou pak druhy *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Trichosporon cutaneum* a *Torulaspora delbrueckii* (Seiler a Busse, 1990; Bintsis et al., 2000).

V počátečních stádiích zrání sýrů se kvasinky rozmnožují velmi rychle. Maximální koncentrace buněk se může pohybovat v rozmezí $10^6 - 10^9$ CFU·g⁻¹ (Roostita a Fleet, 1996). Obecným trendem je dominance kvasinek během počátečních stádií zrání sýrů, kdy se následně do procesu zapojují bakterie (Corsetti et al., 2001).

Nejen bakterie, ale i některé kvasinky, se jeví být vhodné jako startovací kultury a to díky jejich zajímavým technologickým vlastnostem. V mnohých případech jsou kvasinky používány jako tzv. sekundární startovací kultury a bývají většinou aplikovány za účelem zvýšení aroma nebo k podpoře růstu jiných mikroorganismů (Hui et al., 2004). Nicméně při selekci startovacích kultur musí být pozornost upřena na ekologickou adaptaci kmenů použitých k inokulaci, k jejich schopnosti kolonizovat a adaptovat se na podmínky daného prostředí a k interakcím vyskytujícím se mezi mikroorganismy. Navíc přídavek mikroorganismů, vykazujících specifickou funkci v čisté kultuře, nemusí nezbytně vést ke stejným fenotypovým vlastnostem ve směsné kultuře. Výše uvedené odhaluje limitaci strategií založených na přidavku jednotlivých kmenů ke komplexní mikroflóře vyskytující se přirozeně na povrchu sýrů (Irlinger a Mounier, 2009).

Jak bylo zmíněno výše, některé individuální druhy kvasinek mohou mít konkrétní vliv na organoleptické vlastnosti a texturu sýrů a mohou být tedy použity jako startovací kultury.

Běžně zastoupeným druhem v sýrech je *Debaryomyces hansenii*. Druh *D. hansenii* je jeden z osmotolerantních druhů. Nicméně autoři Gori et al. (2005 a 2007) uvádí, že osmotolerance se může u jednotlivých kmenů lišit, nejvíce osmotolerantní kmeny jsou pak schopny růst v prostředí obsahujícím až 24 % NaCl. Pro srovnání lze uvést příklad, kdy růst druhu *S. cerevisiae* (považovaný za středně osmotolerantní druh) je inhibován koncentrací solí nad 10 %. Schopnost odolávat vysokým koncentracím solí je dána intracelulární akumulací kompatibilních osmolytů – konkrétně glycerolu. *D. hansenii* má schopnost růst při nízkých teplotách a nízké vodní aktivitě. Tento druh může asimilovat kyselinu mléčnou, citronovou stejně jako galaktózu i v přítomnosti vyšších koncentrací NaCl. Kmeny *D. hansenii* taktéž produkují širokou škálu enzymů, které přispívají ke zrání sýrů. Jedná se zejména o enzymy proteolytické a lipolytické. Také byly detekovány další enzymové aktivity jako je fosfatázová, β-galaktosidázová a esterázová (van den Tempel a Jacobsen, 2000). Dále autoři Prillinger et al. (1999) uvádí, že převaha druhu *D. hansenii* v některých sýrech může snížit riziko vzniku nežádoucích vlastností sýrů způsobených druhem rodu *Clostridium*, což je zapříčiněno schopností druhu produkovat antimikrobiální látky. Známá je i schopnost produkce organolepticky aktivních látek, jako jsou například methylketony, 2-fenylethanol a S-methylthioacetát (Ferreira a Viljoen, 2003; Tamag a Fleet, 2009).

Druh *Y. lipolytica* je na rozdíl od druhu *D. hansenii* schopen asimilovat velmi málo sloučenin a je senzitivní k NaCl (růst je inhibován již při koncentracích 4 % NaCl a více). Druh vykazuje silnou lipolytickou a proteolytickou aktivitu; roste v prostředí pH 4–6 a při teplotě 10 °C. Díky řadě

esenciálních vlastností může být druh *Y. lipolytica* použitý jako startovací kultura. Jedná se o schopnost růstu a soutěže s jinými druhy kvasinek, kompatibilitu se startovacími kulturami BMK a požadovanou proteolytickou aktivitu (Tamag a Fleet, 2009).

Dalším druhem vyskytujícím se v sýrech je kvasinkovitý mikroorganismus *Geotrichum candidum* (*Galactomyces candidum*). Tento druh je schopen růst při anaerobních podmínkách a při velkém rozmezí pH (3 – 11). *G. candidum* může růst na povrchu i uvnitř sýrů, nicméně koncentrace buněk uvnitř sýrů je nižší než na povrchu. Druh vykazuje lipolytickou a proteolytickou aktivitu s produkcí extracelulárních proteáz schopných degradovat α - a β -kasein. Některé kmeny tohoto druhu však disponují nežádoucí silnou proteolytickou aktivitou, což má za následek nepřijatelnou hořkost sýrů. *G. candidum* může být také aplikován společně s jinou startovací kulturou (nejčastěji *Penicillium camemberti*) (Tamag a Fleet, 2009).

Ve srovnání s výše popsanými druhy bývá jen zřídka v sýrech nalezen druh *S. cerevisiae*. Nicméně tento druh se využívá taktéž jako startovací kultura při výrobě např. sýrů Gorgonzola (Tamag a Fleet, 2009).

2.4.2.1 Role kvasinek během zrání sýrů

Zrání sýrů je mikrobiálně a biochemicky komplexní proces. Na začátku zrání tvaroh představuje přirozené prostředí pro mikrobiální růst – polotuhé prostředí s nízkou vodní aktivitou, nízkým pH (zhruba 4,5), vysokou koncentrací solí závislé na typu sýru pohybující se v rozmezí od 1,5 – 4 % NaCl, vysokou koncentrací kyseliny mléčné, proteinů, lipidů a malé množství zkvasitelných cukrů (Irlinger a Mounier, 2009; Jany a Barbier, 2008). Hlavní funkcí kvasinek během zrání sýrů je metabolické zpracování kyseliny mléčné s následným nárůstem pH z hodnoty 4,5 na 6,5 – 7,5 (Fleet, 2007), což umožní dominanci žádoucím bakteriálním druhům (jako jsou např. *Brevibacterium linens*, *Arthrobacter arilaitensis*, *Corynebacterium casei*), které jsou senzitivní ke kyselému prostředí (Devoyod, 1990). Schopnost kvasinek fermentovat laktózu vede k tvorbě oxidu uhličitého a také ke vzniku organolepticky aktivních sloučenin, jako je etanol a acetaldehyd. Jakmile hodnota pH vzroste nad 5,5, vzrůstá diverzita osmotolerantních bakteriálních druhů přispívajících k zrání sýrů. Kvasinky poté odumírají, lyzují a uvolňují nutriety, jako jsou vitaminy, aminokyseliny aj., které podporují růst bakterií (Fleet, 1990; Irlinger a Mounier, 2009; Boeckhout a Robert, 2003).

Kvasinky vykazují lipolytickou a proteolytickou enzymovou aktivitu, což také přispívá ke zrání sýrů. I přes to, že kvasinky jsou nedílnou součástí mikroflóry během zrání sýrů, je známo jen velmi málo o specifitě proteolytické a lipolytické aktivity (Boeckhout a Robert, 2003).

Fermentace mléčných produktů zahrnuje mikrobiální interakce na několika úrovních popsaných níže. Interakce vedou k tomu, že odlišné mikroorganismy hrají roli v příspěvku k fermentaci a k finální kvalitě produktu. Jedná se o složité interakce mezi primární startovací kulturou, kvasinkami a plísní *Penicillium* sp. u plísňových sýrů a mezi primární startovací kulturou, kvasinkami a bakterií *Brevibacterium linens* a jinými bakteriemi u povrchově zrajících sýrů. Mikrobiální interakce neslouží jen k rozvoji žádoucích mikroorganismů, ale asistují i při eliminaci a kontrole rozvoje nežádoucí mikroflóry včetně specifických kontaminujících mikroorganismů a potenciálních patogenů (Gori a Jespersen, 2010).

Co se týče mechanismů účinku, jedná se zejména o synergismus nebo antagonismus. Synergismus v potravinách spočívá ve vzájemném využívání a produkci živin, dále ve změnách podmínek mikroprostředí (např. pH, redoxní potenciál, aktivita vody a_w), na degradaci specifických antimikrobiálních sloučenin a v kolonizaci složek potravin. Zapojené mikroorganismy mají z těchto

změn prospěch. Na druhou stranu antagonismus, který představuje nejvíce prostudovanou interakci, zahrnuje tvorbu antimikrobiálních metabolitů, jako jsou organické kyseliny, ethanol a jiné alkoholy, oxid uhličitý, peroxid vodíku, diacetyl, produkci bakteriocinů, reuterinů a killerových toxinů, dále soutěž o živiny a nepříznivé změny mikrobiálního prostředí (Corsetti et al., 2001; Gori a Jespersen, 2010).

2.4.3 Kvasinky jako kontaminanty fermentovaných potravin a nápojů

Kvasinky se taktéž mohou podílet na znehodnocování potravin a nápojů, zejména u těch, které jsou kyselé a u nichž je nízká vodní aktivita (a_w). Několik druhů je schopno kazit potraviny produkované i za podmínek dobré výrobní praxe. Tyto mikroorganismy mohou přežívat a růst za stresových podmínek, při kterých nemusí soutěžit s jinými mikroorganismy (Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003). Metabolické procesy kvasinek vedoucí k znehodnocení potravin a nápojů jsou uvedeny v **tab. 6**.

V předchozích kapitolách byl popsán pozitivní vliv kvasinek při výrobě některých fermentovaných potravin a nápojů, a to jak saccharomycetních druhů, tak i druhů nesaccharomycetních. Metabolická aktivita kvasinek je nezbytná během fermentačního procesu. Co jsou tedy kontaminující kvasinky? V mnohých případech mikrobiální kontaminace potravin není jednoduše definována, zejména pak u produkce fermentovaných potravin a nápojů, kde metabolity produkované mikroorganismy přispívají k organoleptickým vlastnostem finálního produktu. Je tedy velmi složité definovat předěl mezi prospěšnou a nežádoucí metabolickou aktivitou. Z kulturních a etnických důvodů je velmi malý rozdíl mezi tím, co je vnímáno jako znehodnocení nebo na druhou stranu jako prospěšná aktivita mikroorganismů (Fleet, 1992; Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003). Jedním z příkladů je produkce 4-ethylfenolu rodem *Brettanomyces/Dekkera* sp., kdy druh *Dek. bruxellensis* je dnes považován za hlavní příčinu znehodnocení vín. Při produkci červených vín je považován tento druh za kvasinku kontaminující, pokud výše zmíněný sekundární metabolit je přítomen v koncentraci vyšší než $620 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě, že koncentrace dané látky bude nižší než $400 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ bude příznivě ovlivňována komplexita aromatické stránky vína (Chatonnet et al., 1992; Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003).

Tab. 6: Metabolické procesy kvasinek vedoucí k znehodnocení potravin a nápojů (Deák et al., 2008).

Proces	Charakter znehodnocení
Energetický metabolismus Fermentace Respirace	Ethanol, CO ₂ , organoleptické těkavé organické kyseliny, estery, karbonylové sloučeniny
Metabolismus dusíku Proteiny AMK	Proteolýza produktů Vyšší alkoholy, organické kyseliny, aminy
Degradace polysacharidů Škrob Pektin	Atenuace piva Macerace rostlinných tkání
Degradace lipidů Hydrolyza TAG	Uvolňování volných MK
Metabolismus síry AMK, SO ₂	H ₂ S, dimethyl sulfid
Autolýza Buňky	MK, thiamin (kvasniční příchut/pachuť)

Boekhout et al. (2002) ve své příručce popsal zhruba 800 druhů kvasinek, nicméně, pouze čtvrtina může být izolována z potravin a jen malá hrstka z nich hraje významnou roli při znehodnocení potravin. Kvasinky, které mohou způsobit nežádoucí změny v potravinách a nápojích jsou uvedeny souhrnně v **tab. 7**. Kontaminující kvasinky uvedené v této tabulce nemusí nutně přispívat ke znehodnocení potravin. Mohou jen v potravinách přežívat, ale nejsou schopny růst a neovlivňují tedy sensorický profil potravin (Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003). V **tab. 8** jsou potom souhrnně uvedeny některé druhy, které jsou považovány za významné kontaminanty společně s jejich významnými fyziologickými vlastnostmi.

Tab. 7: Kontaminující druhy a druhy způsobující znehodnocení potravin a nápojů
(Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003).

Nejčastější kontaminanty (Deák a Beuchat, 1996)	Mikroorganismy způsobující znehodnocení (Pitt a Hocking, 1997)	Další druhy způsobující znehodnocení (Tudor a Board, 1993)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Dek. bruxellensis</i>	<i>C. dattila</i>
<i>D. hansenii</i>	<i>C. holmii</i>	<i>C. globosa</i>
<i>P. anomala</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. humicola</i>
<i>P. membranifaciens</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. lactis-condensi</i>
<i>R. glutinis</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>Y. lipolytic</i>
<i>R. mucilaginoso</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>T. delbrueckii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. saké</i>
<i>Kl. marxianus</i>	<i>Sch. pombe</i>	<i>C. versatilis</i>
<i>I. orientalis</i>	<i>Z. bailii</i>	<i>C. zeylanoides</i>
<i>Z. bailii</i>	<i>Z. bisporus</i>	<i>Cryptococcus sp.</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>Ha. antala</i>
<i>Z. rouxii</i>		<i>Ha. subpelliculosa</i>
<i>C. zeylanoides</i>		<i>Kl. marxianus</i>
<i>C. albidus</i>		<i>P. burtonii</i>
<i>C. tropicalis</i>		<i>P. fermentans</i>
<i>S. exiguus</i>		<i>Sp. roseus</i>
<i>P. fermentans</i>		<i>T. delbrueckii</i>
<i>H. uvarum</i>		<i>Tr. cutaneum</i>

Tab. 8: Některé druhy kvasinek spojované se znehodnocováním potravin a nápojů (Deák et al., 2008).

Kvasinka	Významné vlastnosti
<i>Debaryomyces hansenii</i> (<i>Candida famata</i>)	Vysoce osmotolerantní; často nalezený v solených masných produktech, sýrech, nakládané zelenině; způsobuje biofilm na povrchu a off-flavour
<i>Dekkera sp./Brettanomyces sp.</i> (<i>D. anomala</i> , <i>D. bruxellensis</i>)	Pomalý růst, odolný vůči ethanolu a CO ₂ ; hodně spojovaná se znehodnocením alkoholických a sycených nápojů; způsobuje zákal, kyselou, fenolickou pachutí a myšinu
<i>Hanseniaspora uvarum</i> (<i>Kloeckera apiculata</i>)	Velmi odolný druh vůči kyselému prostředí; často spojovaný se znehodnocením fermentovaných nápojů
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>Candida kefyr</i>)	Fermentace laktózy; produkce pektolytických a proteolytických enzymů; růst při 40 – 45 °C a i při nízkých teplotách; znehodnocení mléčných a rostlinných produktů
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>Candida pelliculosa</i>)	Odolný vůči kyselinám a osmotickému stresu; produkuje vysoké množství ethyl acetátu; způsobuje kontaminace mléčných produktů, ovoce a pekařských výrobků
<i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Candida krusei</i>)	Tolerantní ke kyselému prostředí, odolný vůči konzervantům; způsobuje kontaminace během fermentace, tvorbu biofilmu při nízkém pH produktů
<i>Pichia membranifaciens</i> (<i>Candida valida</i>)	Oxidativní, ethanol tolerantní, odolný vůči konzervantům; způsobuje biofilm a off-flavour mnoha produktů
<i>Rhodotorula sp.</i>	Oxidativní; vykazují lipolytickou, proteolytickou a pektolytickou aktivitu; častý kontaminant povrchů mněčných výrobků, masa, ovoce, zeleniny a pekařských produktů
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermentační znehodnocení většiny potravin a nápojů obsahujících monosacharidy a disacharidy
<i>Kazachstania exiguus</i> (<i>Candida holmii</i>)	Mírně tolerantní ke konzervantům, kyselině octové a solím; fermentativní znehodnocení ovocných šťáv, sycených nápojů, majonéz, zeleninových salátů, mléčných a masných výrobků
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Osmo a ethanol tolerantní; odolný vůči konzervantům, fermentativní znehodnocení produktů s vysokou koncentrací sacharidů a alkoholických nápojů
<i>Yarrowia lipolytica</i> (<i>Candida lipolytica</i>)	Oxidativní, vykazuje silně proteolytické a lipolytické aktivity, mírně tolerantní k nízkému pH, vysoké koncentraci solí a konzervantů; způsobují off-flavour a změny v textuře masa a mléčných výrobků
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Odolný vůči konzervantům, kyselinám, ethanol tolerantní; fermentativní znehodnocení ovocných šťáv, džusů, sirupových koncentrátů, alkoholických nápojů
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Osmotolerantní, rezistentní vůči konzervantům, fermentace džusů, sirupů, medu, marmelád, cukrovinek, sušeného ovoce

Mikrobiální **znehodnocení vín** může být způsobeno jak aktivitou bakterií mléčného kvašení a octovými bakteriemi, tak také kvasinkami. V mnohých případech se jedná o kontaminace bakteriálního původu. Na druhou stranu jsou v dnešní době některé druhy kvasinek obávanou kontaminací vedoucí k velkým ekonomickým ztrátám. Nejčastějšími projevy znehodnocení mohou být tvorba filmu u skladovaných vín, sedimenty, produkce plynů v láhvích a možný nežádoucí zápach a chuť vyskytující se ve všech stádiích fermentačního procesu (Kunkee a Bisson, 1993). Ve víně se poté většinou nachází větší množství esterů, kyseliny octové a sirovodíku. U vín, která jsou vystavena vzduchu, se na povrchu může vytvářet film slabě fermentativních nebo oxidativních rodů kvasinek, jako je *Candida sp.*, *Pichia sp.* nebo *Hansenula sp.* Některé druhy těchto rodů jsou schopny oxidovat ethanol, glycerol a organické kyseliny. Ve výsledku dostáváme vína s vyšším obsahem acetaldehydu, esterů a kyseliny octové, což je pro senzorickou kvalitu vína nežádoucí (Sponholz, 1993). Jak žádoucí, tak nežádoucí kvasinková mikroflóra může produkovat látky způsobující vady a nemoci vína (du Toit a Pretorius, 2000). Například je možné zmínit schopnost některých kmenů *S. cerevisiae* produkovat nadprahové koncentrace H₂S. (Renouf a Lonvaud-Funel, 2007) Příklady některých druhů kvasinek a jejich negativní působení na kvalitu vína jsou uvedeny v **tab. 9**.

Tab. 9: Možné kontaminující kvasinky a příklady jejich biochemické aktivity způsobující vady vína (Martorel et al., 2006; Dias et al., 2003; Thomas, 1993; du Toit a Pretorius, 2000).

Druh	Potenciální vliv na kvalitu vína	Vada
<i>Brettanomyces/Dekkera Dek. bruxellensis</i>	Produkce těkavých fenolů Velkého množství kyseliny octové	Myšina Zemité nákaza
<i>Candida</i> sp. <i>C. vini</i> <i>C. stellata</i> <i>C. krusei</i>	Vína vystavena přístupu vzduchu – tvorba filmu Oxidace ethanolu – vysoká koncentrace acetaldehydu, těkavých kyselin a esterů	Tvorba filmu Křís
<i>H. uvarum</i>	Produkce vysoké koncentrace kyseliny octové; velké množství ethylacetátu, isoamylacetátu a methylbutylacetátu a tvorba filmu	Křís Octovatění
<i>M. pulcherrima</i>	Tvorba filmu; produkce velkého množství ethylacetátu a acetaldehydu	Tvorba filmu
<i>Pichia</i> sp. <i>P. membranifaciens</i>	Tvorba kožky; produkce velkého množství acetaldehydu	Tvorba kožky
<i>S. cerevisiae</i>	Re-fermentace vín se zbytkovým cukrem Produkce H ₂ S	Re-fermentace Sirka
<i>S. ludwigii</i>	Vysoká koncentrace acetaldehydu	–
<i>Sch. pombe</i>	Re-fermentace lahvových vín; deacidifikace	Re-fermentace
<i>Z. bailii</i>	Sekundární fermentace vín s velkým množstvím CO ₂ Turbidita a sedimentace Vysoká produkce kyseliny octové a esterů	Křís

Možné **vady** lze taktéž sledovat i **u produkce sýrů**. I přes to, že kvasinky jsou považovány za důležité mikroorganismy účastníci se zrání sýrů, mohou na druhou stranu způsobovat i kontaminace. Rozdíl mezi prospěšnou a nežádoucí funkcí kvasinek je, stejně jako v případě produkce vína, kmenově závislý (Addis et al., 2001). Kvasinky bývají nalezeny v čerstvém nebo pasterizovaném mléce ve velmi nízké koncentraci pohybující se od 10¹ do 10³ CFU·ml⁻¹ a z důvodu skladování mléka při nízkých teplotách bývají většinou přerosteny psychrofilními bakteriemi. Nicméně v nepřítomnosti bakteriální soutěže je mléko výborným substrátem pro rozvoj kvasinek. Kvasinky tak mohou dosáhnout koncentrace 10⁸ až 10⁹ CFU·ml⁻¹ (Roostita a Fleet, 1996). Proto jsou fermentované mléčné produkty náchylné ke kvasinkové kontaminaci (zvyšují kyselost a omezují tedy činnost bakterií a jejich soutěžení o živiny). Mezi běžné defekty sýrů patří produkce plynů, kvasnicový a jiný zápach, změna barvy a textury (Jacobsen a Narvhus, 1996). Jako příklad můžeme uvést např. druh *Y. lipolytica*, který může skrze oxidaci tyrosinu způsobovat hnědé skvrny na povrchu sýrů (Carreira et al., 1998). Touto tyrozinázovou aktivitou mohou disponovat i jiné druhy, např. *D. hansenii* (van den Tempel a Jacobsen, 2000).

3 CÍLE PRÁCE

Experimentální část předložené disertační práce je zaměřena na izolaci, identifikaci a charakterizaci kvasinek spojených s výrobou jihomoravského vína a s produkcí ručně vyráběných sýrů pocházejících ze zemí západního Balkánu. Jednotlivé dílčí cíle práce jsou potom následující:

- Prostudovat kvalitativní zastoupení kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů při výrobě moravských vín.
- Z izolovaných kvasinek získaných z vinice a ze spontánně kvašených moštů identifikovat kmeny rodu *Saccharomyces* a následně otestovat jejich vhodnost pro aplikaci ve fermentačním procesu výroby vína.
- Zhodnotit zastoupení kvasinkové mikroflóry tradičních ručně vyráběných sýrů produkovaných zeměmi západního Balkánu (Srbsko, Chorvatsko).
- Otestovat nově navrženou semi-kvantitativní metodu založenou na analýze metagenomické DNA, která je určena k přímé analýze kvasinek a plísní ze vzorků sýrů a jejich meziproductů (metoda ITS genomová knihovna spojená s restrikční analýzou).

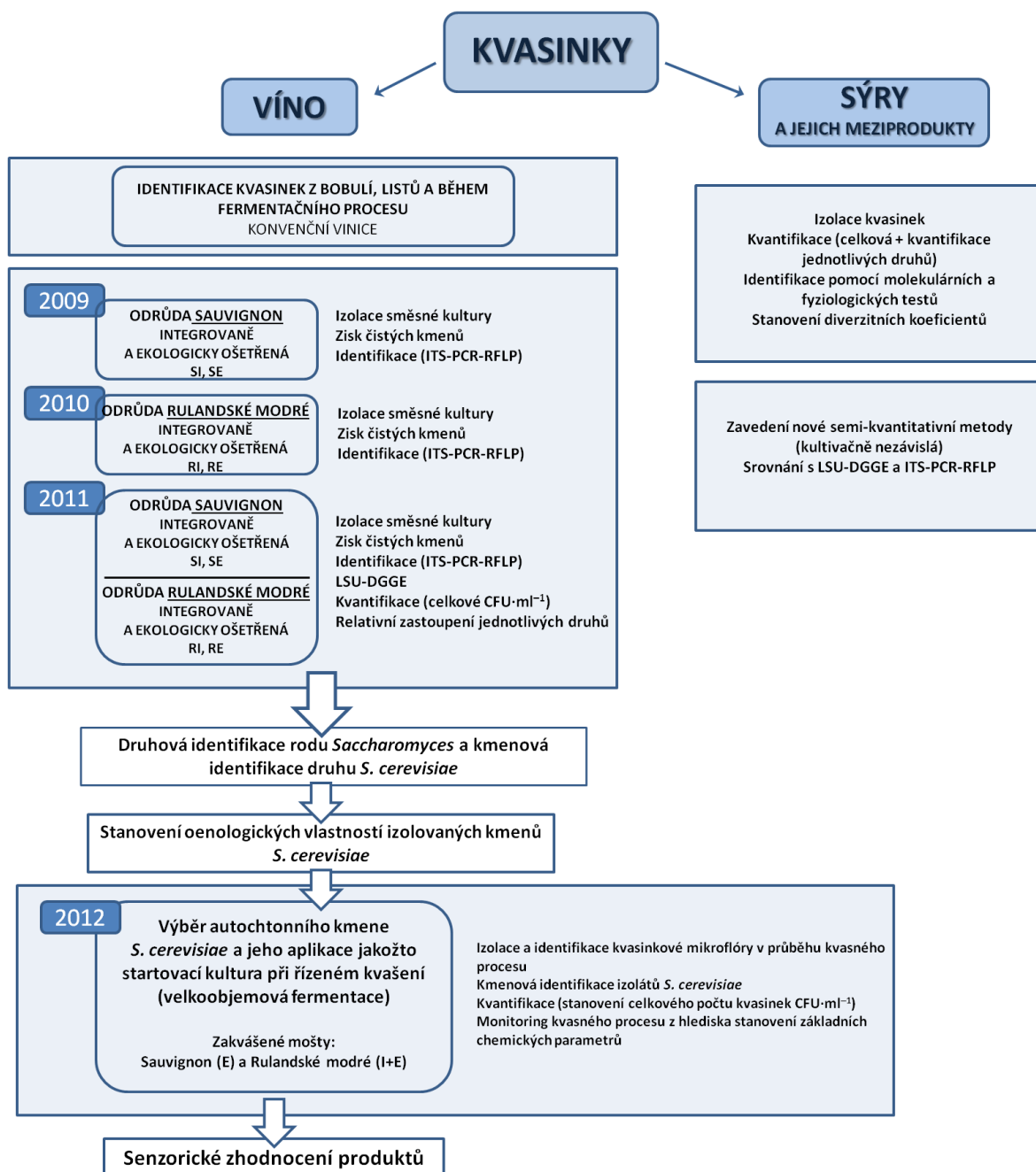
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak již bylo zmíněno, diverzita a složení kvasinkové populace přispívá k sensorickému charakteru vína (Romano et al., 2003; Fleet, 2003a; Jolly et al., 2006), a proto jsou tedy moderní biotechnologické přístupy při jeho výrobě zaměřeny zejména na monitoring mikrobiální populace (charakterizace mikrobiálního složení během fermentačního procesu), na kontrolu kvasného procesu z hlediska rozvoje nežádoucí kvasinkové mikroflóry a taktéž na selekci a využití startovacích kultur kvasinek izolovaných z vlastních vinic (Ciani et al., 2011). Jak bylo uvedeno v úvodu a teoretické části práce, kvasinky jsou nedílnou součástí mikrobiální populace nejen při produkci fermentovaných nápojů, ale taky hrají důležitou roli při výrobě jiných potravin, jako jsou např. sýry. Díky specifickým enzymatickým aktivitám přispívají k jejich zrání (Boeckhout a Robert, 2003) a stejně jako při produkci vína ovlivňují sensorickou kvalitu výsledného produktu. Disertační práce je tedy zaměřena na identifikaci kvasinek izolovaných během procesu produkce moravských vín a na identifikaci a komplexní studii kvasinkové mikroflóry spojené s tradičně ručně vyráběnými zahraničními sýry.

Předložená praktická část disertační práce je rozdělena na tři části. První část se věnuje **sledování biodiverzity povrchu bobulí a monitoringu kvasného procesu** z hlediska kontroly rozvoje kvasinek a charakterizace mikrobiálního složení spontánně kvašených moštů při výrobě červeného a bílého vína. Druhá část je zaměřena na identifikaci, testování a následnou **aplikaci vybraného autochtonního kmene *S. cerevisiae*** v praxi. Poslední část se zabývá **identifikací kvasinek spojených s tradičně ručně vyráběnými zahraničními sýry**. Součástí poslední části je i **návrh, zavedení a zhodnocení semi-kvantitativní identifikační metody** určené k přímé charakterizaci kvasinek a plísní v potravinových maticích.

Souhrnné schéma dílčích bodů praktické části disertační práce je uvedeno na **obr. 11**. Výsledky jsou zpracovány formou komentářů k pracím, které byly publikovány v odborných mezinárodních impaktovaných časopisech nebo byly zaslány/přijaty k recenznímu řízení. Jednotlivé články jsou uvedeny v přílohách 1 – 5 na konci práce. Data, která nejsou součástí publikací, jsou uvedena i s diskuzí v příslušné kapitole.

Hlavními použitými metodami byly především molekulární typizační techniky založené na polymerázové řetězové reakci (PCR): ITS-PCR-RFLP za použití tří až sedmi restričních endonukleáz, PCR-fingerprinting (rep-PCR, RAPD), amplifikace delta oblastí za použití PCR, LSU-DGGE, sekvenace oblasti ITS rDNA a sekvenace oblasti D1/D2 LSU rDNA (příprava klonováním do plazmidu). Zavedena a zhodnocena byla i nová semi-kvantitativní metoda založená na konstrukci ITS genomové knihovny spojené s restriční analýzou. Genomová DNA byla z kvasinek izolována za použití komerčně dostupných souprav pro izolaci DNA. Taktéž byly použity klasické identifikační metody – fyziologické testy (cca 60 testů). Detailní informace o použitém materiálu a metodách jsou uvedeny v jednotlivých publikacích v přílohách disertační práce. Pokud příslušná metoda není součástí některé z publikací, je popis provedení metody uveden v textu disertace jako poznámka pod čarou.



Obr. 11: Souhrnné schematické znázornění praktické části předložené disertační práce.

4.1 Identifikace kvasinek izolovaných z bobulí a během procesu výroby moravských vín

V současné době existuje řada studií zabývajících se monitoringem kvasinkové populace na mnoha vinicích na světě. Autochtonní mikroflóra, přítomna na bobulích, je však regionálně specifická a její složení závisí i na dalších faktorech, jako je např. počasí, druh ošetření vinice aj. (Fleet et al., 2002). Při spontánní fermentaci, která pomáhá zachovávat regionální charakter vína, vstupuje do procesu primární (kmeny vyskytující se na bobulích) a sekundární mikroflóra (pochází z prostředí zpracování bobulí). Diverzita a složení kvasinkové populace výrazně přispívají k sensorickému charakteru vína. Růst každého druhu je doprovázen jejich specifickými metabolickými aktivitami, které ovlivňují koncentrace organolepticky aktivních látek a tedy finální sensorickou kvalitu daného produktu. Z tohoto důvodu je důležité stanovit složení mikroflóry v průběhu výroby vína (Romano et al., 2003; de Melo Pereira et al., 2010; Jolly et al., 2006).

Za účelem monitoringu a zhodnocení kvalitativního zastoupení kvasinek v průběhu kvasného procesu výroby vín byly analyzovány spontánně kvašené mošty připravené z bobulí pocházejících z (i) **konvenčně**, (ii) **integrovane** a **ekologicky** ošetřené vinice. Současně byly kvasinky izolovány i z bobulí a to za účelem stanovení složení mikroflóry vstupující do procesu výroby vína a taktéž k posouzení případného vlivu použité agrotechniky. Na základě nejen regionalit produktu, ale i různých typů ošetření vinice, byly vzorky odebírány ve dvou podoblastech jihomoravské vinařské oblasti: **velkopavlovická** – konvenční vinice a **mikulovská** – integrovaná a ekologická vinice. Z důvodu odlišného roku izolace kmenů, rozdílné vinice a použité odrůdy, byla identifikace kvasinek izolovaných z bobulí pocházejících z konvenčně ošetřené vinice a v průběhu výroby vína z těchto bobulí řešena jako samostatná problematika a je tedy zpracována jako oddělená kapitola.

Konvenční způsob pěstování vinné révy je běžný a dříve nejvíce užívaný způsob obhospodařování vinice. K ošetření vinice lze použít všechny komerčně dostupné preparáty (hnojiva, chemické pesticidy). V tomto systému je však nejvíce narušena přírodní rovnováha na vinohradu. Na druhou stranu integrovaný a ekologický způsob zemědělství má za cíl dosáhnout optimálních výnosů vyšší kvality cestou, která nezatěžuje životní prostředí. Ekologická produkce se řídí podle směrnice 2093/91 EU a v České republice navíc ještě zákonem 242/2000 Sb. a vyhláškou 53/2001 Sb. v aktuálním znění. Integrovaná produkce představuje způsob zemědělského hospodaření, který upřednostňuje přirozenější alternativy ochrany rostlin a zároveň snižuje závislost na pesticidech. Jde o přechod mezi konvenčním a ekologickým systémem. Oba přístupy (ekologický i integrovaný) jsou založeny na minimalizaci, respektive úplném vyloučení použití hnojiv a jakýchkoliv chemických postřiků (<http://eagri.cz>). V současné době představují výrobky ekologického zemědělství pro řadu spotřebitelů atraktivní produkty.

Kvasinky byly současně izolovány z bobulí a z různých fází spontánně kvašeného moštu (bez přídavku komerční kultury a SO₂), který byl odebírán sterilně v pravidelných intervalech pokrývající celý kvasný proces, s rozdílem použité odrůdy, způsobu ošetření vinice a roku odběru (viz **obr. 11**). Sterilně odebírané bobule byly inkubovány v tekutém sladidlovém médiu; mošt byl přefiltrován přes mikrobiologický filtr, který byl následně inkubován na sladidlovém agaru. Získané směsné kultury byly přečištěny na čisté kvasinkové kmeny (4 – 6 krát; ředěním ve sterilní vodě s následným křížovým roztěrem). Ty byly následně podrobeny identifikaci za použití metod založených na analýze DNA. Z buněk byla DNA izolována za použití komerčně dodávané soupravy UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit podle návodu dodávaného výrobcem. K identifikaci byla použita metoda PCR-RFLP amplifikující oblast vnitřního přepisovaného mezerníku ITS: ITS1 a ITS2 a gen 5,8S rDNA (za použití primerů ITS1 – ITS4) spojená s následným štěpením amplikonů s třemi

až sedmi restrikčními endonukleázami, které stěpí DNA v daných specifických sekvencích. Použity byly enzymy *HaeIII*, *HinfI*, *TaqI*, *AluI*, *MseI*, *HpaI* a *HhaI*. Restrikční fragmenty, stejně jako PCR amplikony, byly detekovány za použití agarózové gelové elektroforézy. Z gelů byly odečteny velikosti fragmentů podle použitého délkového standardu (markeru) a restrikční profily byly vyhodnoceny (seskupeny) v programu BioNumerics 6.5 za použití UPGMA klastrové analýzy. Podle získaných restrikčních profilů byly neznámé izoláty druhově (některé pouze rodově) zařazeny a to srovnáním s námi předem připravenou databází restrikčních fragmentů amplifikované 5,8S ITS rDNA sbírkových kmenů (pocházejících ze sbírky CCY Bratislava). Problematika genotypové identifikace sbírkových kmenů, které slouží jako kmeny srovnávací při druhové identifikaci izolátů, byla řešena v diplomové práci Šuranská (2008). Databáze velikosti restrikčních fragmentů je uvedena v rámci této diplomové práce. Za účelem srovnání restrikčních fragmentů izolátů byla taktéž využita databáze kmenů pocházejících ze sbírky CECT Španělsko, která je uvedena v publikaci Esteve-Zarzoso et al. (1999). Neznámé izoláty byly identifikovány taktéž na základě fyziologických testů pracovníky sbírky CCY, SAV Bratislava a reprezentativní vzorky (jeden z příslušné skupiny vytvořené srovnáním velikostí restrikčních fragmentů – celkem 42) byly následně sekvenovány (sekvenace ITS oblasti rDNA; ElisabethPharmacon s.r.o.). Získané sekvence (ve FASTA formátu) byly vyhodnoceny za použití databáze NCBI Blast (National Center for Biotechnology Information Database; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvenované taxonomicky zařazené izoláty i s velikostmi restrikčních fragmentů jsou uvedeny v příloze 6.

4.1.1 Izolace a identifikace kvasinek z bobulí a fermentovaných moštů z konvenční vinice

Byla provedena identifikace kvasinek vyskytujících se přirozeně na bobulích, listech a v průběhu spontánního kvasného procesu výroby moravského vína. Kvasinky byly izolovány z bobulí, listů odrůdy vinné révy (*Vitis vinifera*) Veltlínské zelené a Svatovavřínecké a spontánně kvašeného moštu odrůdy Veltlínské zelené z obce sídlící ve **velkopavlovické vinařské podoblasti** na jižní Moravě. Kvasinky byly izolovány během vinařské sezóny v roce 2007, přečištěny a uchovány na šikmých agarech pod vrstvou parafinového oleje. V rámci této práce byla provedena identifikace celkem 97 izolovaných kmenů. Kompletní výsledky a diskuze jsou uvedeny v příloze 1 jako součást článku Šuranská et al., *Chemical Papers*, 2012 a v této podkapitole jsou shrnuty.

Jak již bylo zmíněno výše, za účelem identifikace byla volena metoda ITS-PCR-RFLP. Za použití primerů ITS1 – ITS4 byla amplifikována oblast ITS rDNA. Velikosti amplifikovaných fragmentů genomové DNA se pohybovaly v rozmezí od 390 – 880 bp, vždy v závislosti na rodu (např. 880 bp přísluší rodu *Saccharomyces*; 390 bp rodu *Metschnikowia* apod.). Ze všech analyzovaných vzorků (bobule, listy, mošty) bylo metodou ITS-PCR-RFLP identifikováno celkem 13 druhů náležících do 9 rodů (viz **tab. 10** a **tab. 11**). Velikosti restrikčních fragmentů a výsledný dendrogram izolátů identifikovaných metodou ITS-PCR-RFLP jsou uvedeny v rámci přílohy 1 a výsledky jsou popsány níže.

4.1.1.1 Výskyt autochtonní kvasinkové populace na bobulích a listech

Bobule jsou považovány za primární zdroj vinných kvasinek (Fleet et al., 2002). Na analyzovaných bobulích (**tab. 10**) byly nalezeny 4 různé druhy kvasinek. Kromě druhu *H. uvarum*, který, jak uvádí Pretorius (2000), je považován za nejčastěji se vyskytující druh spojený s mikrobiálním ekosystémem bobule, a který byl detekován na bobulích obou odrůd, byl taktéž identifikován druh *M. pulcherrima*

(Veltlínské zelené) a *P. fermentans* spolu s druhem *T. delbrueckii* u odrůdy Svatovavřínecké. Jedná se o běžně se vyskytující druhy kolonizující povrch bobulí (Jolly et al., 2006; Renouf et al., 2007). Rod *Saccharomyces* nebyl na bobulích detekován pravděpodobně z důvodu jeho velmi nízké koncentrace, která se, podle autorů Martini a Vaughan-Martini (1990); Fleet et al. (2002); Raspor et al. (2006) pohybuje v rozmezí $> 10 - 100 \text{ CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Analýza mikrobiální komunity kvasinek studované na listech (**tab. 10**) ukázala výskyt 3 různých druhů. Na listech obou odrůd byl detekován kvasinkovitý mikroorganismus *A. pullulans*, který bývá nejčastěji nalezen na nezralých bobulích. *A. pullulans* je označován za široce rozšířeného saprofyta ve fylosféře a bývá považován za potenciálního biokontrolního činitele proti šedé plísni *Botrytis cinerea* (Schena et al., 2003; Raspor et al., 2006). Kromě zmíněného kvasinkovitého mikroorganismu byl na listech obou odrůd detekován i basidiomycetní druh *R. glutinis* a u červeného vína ještě apikulátní druh *H. uvarum*.

Tab. 10: Srovnání druhů kvasinek izolovaných z listů a bobulí odrůd bílého a červeného vína identifikovaných metodou ITS-PCR-RFLP.

Matrice	Identifikované druhy	
	Bílé víno Veltlínské zelené	Červené víno Svatovavřínecké
Listy	<i>A. pullulans</i> <i>R. glutinis</i>	<i>A. pullulans</i> <i>H. uvarum</i> <i>R. glutinis</i>
Bobule	<i>H. uvarum</i> <i>M. pulcherrima</i>	<i>H. uvarum</i> <i>P. fermentans</i> <i>T. delbrueckii</i>

4.1.1.2 Monitoring kvasinkové populace v průběhu výroby vína

Během fermentačního procesu výroby bílého vína odrůdy Veltlínské zelené bylo detekováno 9 druhů kvasinek. Jednotlivé identifikované druhy v závislosti na čase odběru jsou uvedeny souhrnně v **tab. 11**. Brzká stádia fermentačního procesu jsou charakteristická výskytem nesaccharomycetních druhů, které jsou metabolicky aktivní a jejichž metabolity ovlivňují sensorickou kvalitu vína (Jolly et al., 2006). V prvních fázích fermentačního procesu obvykle převládá apikulátní druh *H. uvarum*, který se podílí na produkci žádoucích těkavých organických látek přispívajících k organoleptickému charakteru vína (Pretorius, 2000). V našem případě se druh *H. uvarum* vyskytoval do 5. dne fermentačního procesu. *H. uvarum* obecně toleruje koncentraci alkoholu do 3 – 4 % (Pina et al., 2004). V počátečních fázích fermentačního procesu byly taktéž izolovány druhy rodu *Pichia* (*P. fermentans*, *P. kluyveri* a *P. membranifaciens*), které nebyly detekovány na bobulích. Tyto druhy bývají spojovány s prostředím vinného sklepa a vybavením používaným při zpracování bobulí (Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003). Druh *P. membranifaciens* je schopen oxidovat ethanol, glycerol a organické kyseliny. Ve výsledku mohou být produkována vína s nepříjemnou vysokou koncentrací acetaldehydu, esterů a kyseliny octové (Fleet, 2001). Dále byly detekovány basidiomycetní obligátně aerobní druhy náležící do rodů *Rhodotorula* sp., *Rhodospiridium* sp. a *Sporidiobolus* sp., které jsou označovány jako indikátory nedodržení anaerobních podmínek (Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003).

Tab. 11: Identifikované druhy izolované z moštu odrůdy Veltlínské zelené v různých dnech (t) během spontánního fermentačního procesu.

t/den	Identifikované druhy
1	<i>H. uvarum</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. fermentans</i>
3	<i>H. uvarum</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. membranifaciens</i>
5	<i>H. uvarum</i> , <i>P. kluyveri</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>Sp. salmonicolor</i> , <i>Rh. toruloides</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>S. cerevisiae</i>
7	<i>P. kluyveri</i> , <i>P. fermentans</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i>
9	<i>P. fermentans</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i>
11	<i>P. membranifaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i>
13	<i>P. membranifaciens</i> , <i>S. cerevisiae</i>
15	<i>S. cerevisiae</i>
17	<i>S. cerevisiae</i>
19	<i>S. cerevisiae</i>

Druhy rodu *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* a *S. bayanus*), zodpovědné za alkoholové kvašení, byly detekovány až v pozdějších fázích fermentačního procesu a to od pátého dne fermentace. Tento rod, stejně jako na bobulích, nebyl detekován v počátečních fázích fermentačního procesu. Výskyt saccharomycetních kmenů v počátečních fázích kvašení nebylo možné sledovat klasickými izolačními metodami kvůli jejich nízké koncentraci ve vzorku, která byla zřejmě pod limitem detekce kultivační metody.

Řada autorů uvádí, že je obecně velmi složité odlišit druhy rodu *Saccharomyces* (dos Santos et al., 2007; Huang et al., 2008, Muir et al., 2011). Izoláty řadící se do rodu *Saccharomyces* bylo tedy nutné identifikovat jinou metodou než ITS-PCR-RFLP. Na základě metody ITS-PCR-RFLP bylo možné zařadit tyto izoláty pouze rodově a odlišit je od jiných nesaccharomycetních rodů (na základě velikosti ITS amplikonu, který je pro rod *Saccharomyces* 880 bp). Za účelem odlišení druhů rodu *Saccharomyces* byla tedy použita metoda PCR-fingerprinting. Aplikována byla metoda rep-PCR za použití mikrosatelitních oligonukleotidových primerů a primeru M13. Reprodukovatelné fingerprinty složené z určitého počtu distribuovaných fragmentů odlišné velikosti a intenzity byly srovnány v programu BioNumerics. Srovnáním fingerprintů izolátů s fingerprinty sbírkových kmenů byly identifikovány dva druhy – *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. Výsledný obraz fingerprintů a dendrogram ukazující genetickou podobnost izolátů rodu *Saccharomyces* jsou uvedeny v příloze 1. Identifikace rodu *Saccharomyces* je však velmi složitá a vyžaduje aplikaci dalších technik zejména za účelem zjednodušení identifikace a možnosti identifikovat druh *S. cerevisiae* až na kmenovou úroveň, což je důležité např. při použití autochtonních kmenů jakožto startovacích kultur. Identifikace kvasinek rodu *Saccharomyces* je podrobněji řešena v rámci kapitoly 4.2.1.

4.1.2 Izolace a identifikace kvasinek z bobulí a fermentovaných moštů z integrované a ekologicky ošetřené vinice

V letech 2009 – 2011 byla provedena izolace a posléze identifikace čistých kultur kvasinek z bobulí a spontánně kvašených moštů odrůdy: Sauvignon (ročník 2009, 2011) a Rulandské modré (ročník 2010, 2011). Obě odrůdy byly získány jak z ekologicky, tak i z integrovaně ošetřené vinice z **mikulovské vinařské podoblasi** od soukromého vinaře sídlícího v obci Ivaň, jižní Morava. Jednotlivé body práce v závislosti na roce odběru a analýzy vzorků jsou rozepsány souhrnně v **tab. 12**.

Ze vzorků bobulí a moštů byla izolována směsná kultura, která byla přečištěna. Čisté kmeny kvasinek byly následně identifikovány metodou ITS-PCR-RFLP stejně jako v kapitole 4.1.1. Celkem bylo izolováno a identifikováno 524 kmenů, z toho v prvním roce (2009) bylo získáno 132 kmenů, v druhém roce (2010) 133 kmenů a ve třetím roce práce (2011) 259 kmenů. Výsledné restriční profily byly seskupeny v programu BioNumerics 6.5 a srovnáním s databázemi sbírkových kmenů (viz kapitola 4.1) byly druhově zařazeny. Jeden izolát z příslušné skupiny byl taktéž podroben sekvenaci oblasti ITS rDNA, která byla provedena firmou ElisabethPharmacon s.r.o. Získané sekvence ve FASTA formátu byly vyhodnoceny za použití databáze NCBI BLAST. Sekvenovány byly předem amplifikované a přečištěné ITS oblasti rDNA u 42 izolátů. Výsledky druhů identifikovaných na základě sekvenace, velikosti jejich restričních fragmentů a PCR produktů jsou uvedeny v tab. 4 v příloze 6.

Tab. 12: Souhrn jednotlivých bodů práce provedených v letech 2009 – 2011 při analýze moštů z integrovaně (I) a ekologicky (E) ošetřených bobulí.

Rok	Odrůda	Odvedená práce
2009	Sauvignon (I + E)	Izolace kvasinek z moštu a bobulí Získání čistých kultur Identifikace izolátů
2010	Rulandské modré (I + E)	Izolace kvasinek z moštu a bobulí Získání čistých kultur Identifikace izolátů
2011	Rulandské modré (I + E) Sauvignon (I + E)	Izolace kultur kvasinek z moštů a bobulí Získání čistých kultur Identifikace izolátů Kvantifikace Sledování populace kvasinek v moštech pomocí metody LSU-DGGE

4.1.2.1 Výskyt autochtonní kvasinkové populace na bobulích

Z bobulí bylo izolováno 8 autochtonních druhů kvasinek: *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *C. zemplinina*, *Cr. laurentii*, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa*, *P. fermentans* a *S. cerevisiae*. Výsledky izolovaných druhů v závislosti na odrůdě, typu ošetření a roce odběru jsou uvedeny v **tab. 13**.

Pokud srovnáme autochtonní populaci kvasinek vyskytující se na povrchu bobulí, nejvíce druhů bylo detekováno v roce 2009. Druh *H. uvarum* byl nalezen na bobulích všech analyzovaných odrůd; *M. pulcherrima* a ostatní nesaccharomycetní druhy byly izolovány jen v roce 2009 a 2010. V roce 2011 byl izolován pouze druh *H. uvarum* a basidiomycetní druh *R. mucilaginosa*. Basidiomycetní druhy (*R. glutinis*, *R. mucilaginosa*) byly izolovány jen z bobulí odrůdy Sauvignon ekologicky produkované. Zajímavostí je izolace tří kmenů *S. cerevisiae* přímo z bobulí (SI a SE 2009; RI 2011). Druh *A. pullulans*, který bývá součástí nezralých bobulí (Schena et al., 2003) nebyl na bobulích detekován pravděpodobně z důvodu dobré předsklizňové zralosti bobulí nebo velmi nízké koncentrace, která byla pod detekčním limitem metody.

Z daných výsledků vyplývá, že populace kvasinek vyskytující se na povrchu bobulí může být částečně ovlivněna použitou agrotechnikou, protože mezi oběma agrotechnikama byly patrné rozdíly. Např. basidiomycetní druhy byly detekovány pouze na ekologicky ošetřených hroznech. Na druhou stranu, druhy *C. zemplinina* a *Cr. laurentii* byly detekovány pouze na integrovaně ošetřených bobulích odrůdy Sauvignon. Tyto druhy však byly izolovány pouze v roce 2009 a ne v roce

2011. Z toho je taktéž zřejmé, že daná populace je ovlivněna i dalšími faktory, jako je např. počasí v průběhu zrání bobulí a těsně před sklizní.

Tab. 13: Identifikované autochtonní druhy izolované z bobulí odrůdy Sauvignon integrované a ekologicky ošetřené (SI, SE) a Rulandské modré integrované a ekologicky ošetřené (RI, RE). ■ značí výskyt druhů. HU – *H. uvarum*, MP – *M. pulcherrima*, CZ – *C. zemplinina*, CrL – *Cr. laurentii*, RG – *R. glutinis*, RM – *R. mucilaginosa*, PF – *P. fermentans*, SC – *S. cerevisiae*.

Ročník	Odrůda	Druhy							
		HU	MP	CZ	CrL	RG	RM	PF	SC
2009	SI	■	■	■	■				■
	SE	■	■			■	■	■	■
2010	RI	■	■						
	RE	■	■						
2011	SI	■							
	SE	■					■		
	RI	■							■
	RE	■							

4.1.2.2 Výskyt kvasinkové populace v průběhu kvasného procesu výroby vína

Ze všech spontánně kvašených moštů analyzovaných v průběhu let 2009 – 2011 bylo celkem identifikováno 14 druhů náležících do 6 rodů. Identifikovány byly druhy: *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *H. vineae*, *H. osmophila*, *P. fermentans*, *P. membranifaciens*, *P. cecembensis*, *R. mucilaginosa*, *M. pulcherrima* (*C. pulcherrima*), *C. zemplinina*, *C. ethanolica*, *C. pararugosa*, *I. orientalis* (*P. kudriavzevii*, *C. krusei*) a *Z. florentinus*. Výsledky identifikovaných druhů izolovaných z moštů v průběhu celého procesu výroby bílého a červeného vína jsou souhrnně uvedeny v **tab. 14** a **tab. 15**. Zastoupení všech druhů izolovaných z moštů v průběhu kvasného procesu (viz **tab. 14, 15** na str. 52) lze shrnout v následujících bodech:

- Ze všech odrůd analyzovaných vzorků moštů byly izolovány druhy *S. cerevisiae*, *H. uvarum* a *P. cecembensis*. Běžně se vyskytující druh *S. cerevisiae*, který při spontánní fermentaci nebývá zpravidla izolován v počátečních fázích kvašení moštu kvůli jeho velmi nízké koncentraci (Fleet et al., 2002; Raspor et al., 2006). Druh *S. cerevisiae* hraje zásadní roli při anaerobní transformaci sacharidů na etanol (Heard, 1999; Romano, 2003). Na druhou stranu apikulátní druh *H. uvarum* se v moštu vyskytuje jen v počátečních fázích spontánního kvašení (Guillamón et al., 1998; Capece et al., 2004) v důsledku jeho nízké tolerance k alkoholu. Druh *H. uvarum* může v počátcích fermentace dosahovat až 70 % výskytu z celkové populace kvasinek (Fleet, 2001). Nejčastěji se však vyskytuje v čerstvě vylisovaném moštu a na bobulích (Pretorius, 2000).
- Detekce druhu *S. cerevisiae* v pozdějších dnech fermentace může být zapříčiněna spontánní fermentací, kdy se do procesu fermentace zapojují pouze kmeny pocházející z bobulí a z prostředí spojeného se zpracováním bobulí na mošt (Bisson, 2004). Zajímavostí je, že druh *S. cerevisiae* byl izolován z integrované produkované bobulí obou odrůd (Rulandské modré i Sauvignon) dříve, tzn. ve třetím dnu fermentace v porovnání s ekologickou produkcí, kdy byl tento druh izolován až kolem 5. – 8. dne fermentace. Pozdní nárůst kmenů *S. cerevisiae*

u moštu připraveného z ekologicky produkované odrůdy v porovnání s integrovaně produkovanou odrůdou může být zapříčiněn nižší koncentrací buněk *S. cerevisiae* na bobulích, což může být důsledkem např. odlišného ošetření bobulí, ošetření bobulí těsně před sklizní.

- Basidiomycetní druhy byly v průběhu fermentace detekovány jen u odrůdy Sauvignon a to pouze u integrované produkce, kde byl v letech 2009 i 2011 izolován druh *R. mucilaginosa*.
- V počátečních fázích fermentace byly kvůli nízké toleranci k etanolu (stejně jako druh *H. uvarum*) detekovány i následující druhy: *M. pulcherrima* (*C. pulcherrima*), *C. zemplinina*, *C. pararugosa*. V pozdějších fázích fermentačního procesu se tyto druhy již nevyskytují v důsledku inhibičního vlivu vyšší koncentrace etanolu (Granchi et al., 1999; Pina et al., 2004).
- Kromě rodu *Saccharomyces* byly v pozdějších fázích fermentace izolovány i další druhy, jako je *C. ethanolica*, *I. orientalis* a dva druhy rodu *Hanseniaspora* a to *H. osmophila* a *H. vineae*. Všechny tyto nesaccharomycetní druhy odolávají vyšší koncentraci etanolu a produkují sekundární metabolity, které mohou přispívat k chuti a celkovému sensorickému profilu vína (de Melo Pereira et al., 2010). Např. druh *I. orientalis* je schopný degradovat kyselinu jablečnou a navyšovat aroma a *H. osmophila* je známá produkcí 2-fenylacetátu (Rojas et al., 2003; Ugliano a Hensche, 2009; Viana et al., 2008).
- Další nesaccharomycetní druhy, které byly popsány výše, taktéž ovlivňují sensorický profil vín. Např. *M. pulcherrima* může zesilovat aroma; *H. uvarum* přispívá ke komplexitě chuti, neboť zvyšuje koncentraci těkavých organických kyselin (Ugliano a Hensche, 2009).
- Bylo detekováno několik druhů rodu *Pichia*: *P. fermentans*, *P. cecembensis* a *P. membranifaciens*. Druh *P. membranifaciens* se vyskytoval velmi často; nebyl izolován pouze z moštů odrůdy Sauvignon v roce 2009. Jedná se o druh s oxidační aktivitou (Fleet, 2003). I přes to, že je druh *P. membranifaciens* považován za druh kontaminující a poukazuje na nedostatečné vedení fermentačního procesu (Fleet, 2001), je v posledních letech taktéž uváděn jako druh, který díky produkci aromatických látek může navyšovat aroma výsledného produktu (Ugliano a Hensche, 2009). Druh *P. cecembensis*, nedávno izolovaný z exotického ovoce (Bhadra et al., 2007), je v literatuře popisován jako druh velmi fylogeneticky podobný druhům *P. membranifaciens* a *I. orientalis*. Stejně tak autoři Suzuki a Nakase (2002) uvádí blízkou fylogenetickou příbuznost druhu *P. membranifaciens* s druhem *I. orientalis*. Z toho vyplývá, že identifikace druhů rodu *Pichia* není snadná a podrobnější analýza vyžaduje aplikaci dalších molekulárních technik, např. PCR-fingerprinting (rep-PCR aj.).
- Se vzrůstající koncentrací ethanolu byl na konci procesu detekován převážně jenom druh *S. cerevisiae*.
- Druhy *S. bayanus*, *S. pastorianus*, které bývají taktéž spojeny s procesem výroby vína (de Melo Pereira et al., 2010) nebyly detekovány.
- Ani v jednom čerstvém moštu nebyl detekován druh *A. pullulans*, který se vyskytuje na nezralých bobulích (Schena et al., 2003). To poukazuje na dostatečnou zralost bobulí v čase sklizně nebo na jeho velmi nízkou koncentraci v čerstvém moštu, která byla pod limitem detekce použité izolační metody.
- Co se týče zhodnocení případných kontaminujících druhů, tak v současné době je složité definovat co je vlastně kontaminant, pokud svými metabolickými aktivitami daný druh pozitivně přispívá k sensorické stránce finálního produktu. Druhy, které byly v moštech nalezeny, bývají v posledních letech používány i jako startovací kultury neboť svými metabolickými aktivitami pozitivně ovlivňují organoleptický charakter vín.

- Kromě výše zmíněných druhů se v moštu mohly vyskytovat ještě další nesaccharomycetní druhy, které nebyly detekovány. Pokud tyto druhy byly v moštu přítomny, tak jen ve velmi nízké koncentraci, která byla pod detekčním limitem metody, který jak uvádí Prakitchaiwattana et al. (2004) je u kultivačních technik $10^1 - 10^2$ CFU·ml⁻¹. Navíc použití antifungálních činidel může potlačit růst některých kmenů (Barata et al., 2012). Získaná data mohou být taktéž ovlivněna při výběru čistých kultur, které byly odlišeny podle makromorfologických charakteristik vizuálně. Ke ztrátě některých kmenů mohlo dojít taktéž při prvním přečišťování směsné kultury, kdy daná kultura byla ředěna a mohlo tedy dojít ke ztrátě druhů, které byly přítomny v nízké koncentraci.
- K detekci komplexních mikrobiálních systémů se v současné době využívají kultivačně nezávislé techniky (např. DGGE), které pracují s celkovou vyizolovanou DNA, čímž odpadá časová náročnost a experimentální problémy spojené s izolací čistých kultur kvasinek. Nicméně v případě dalšího testování identifikovaných druhů kvasinek (např. při stanovení technologických charakteristik; posouzení jejich určitých aktivit v potravinách apod.), je nezbytné kmény vyizolovat. Navíc u metody DGGE je popisován vyšší limit detekce (10^3 CFU·ml⁻¹) v porovnání s kultivačně závislými metodami (Cocolin et al., 2013; Prakitchaiwattana et al., 2004) a metoda bývá často spojena s experimentálně náročnější sekvenací získaných zón. Taktéž při aplikaci DGGE není možné kvantifikovat danou populaci.
- Obecně platí, že metody závislé na kultivaci jsou stále považovány za metody standardní v detekci kvasinek izolovaných z různých potravinových matric.

Tab. 16: Dny fermentace v daném roce příslušící k číslu odběru (ČO) uvedeném v **tab. 14 a 15**.

Číslo odběru (ČO)	Den fermentace		
	2009	2010	2011
1	1	1	1
2	2	3	3
3	4	5	7
4	8	8	9
5	9	10	11
6	11	12	14
7	14	15	16
8	16	19	18
9	18	21	21
10	21	31	23
11	31	42	25
12	42	52	31

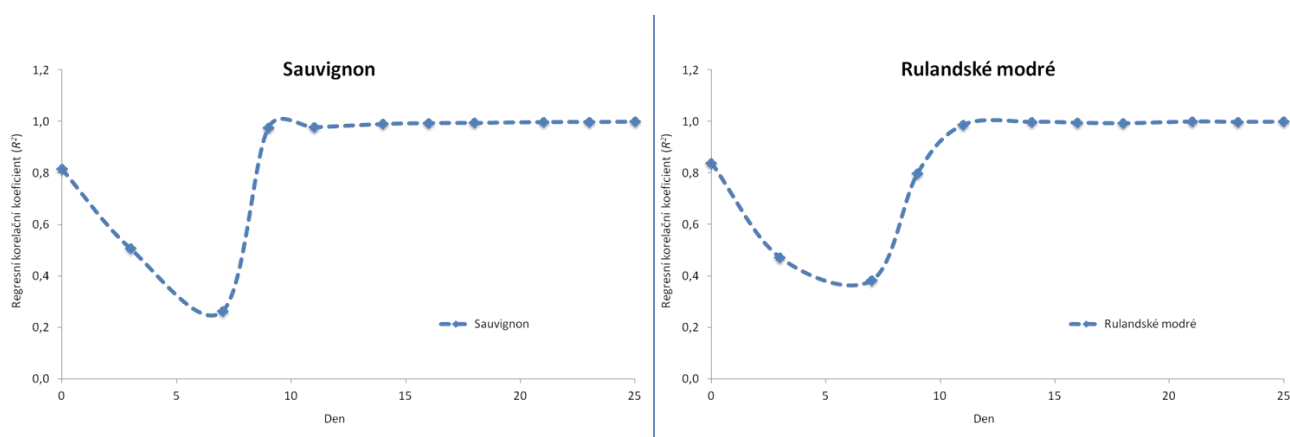
4.1.2.3 Kvantifikace populace kvasinek v průběhu fermentačního procesu

V roce 2011 byla kvasinková populace analyzována ve spontánně kvašených moštích dvou odrůd Sauvignon a Rulandské modré pěstovaných integrovaně a ekologicky. Výsledky izolovaných a identifikovaných druhů jsou uvedeny v **tab. 14, 15** a byly popsány v rámci kapitoly 4.1.2.2. V této části je vyhodnocen celkový počet kvasinek ($\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$, vyjádřený v $\log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) a relativní zastoupení jednotlivých druhů v závislosti na dnu odběru fermentovaného moštu. Kompletní výsledky jsou uvedeny v rámci přílohy 2 (Šuranská et al., *Comparison of yeast species diversity in spontaneously fermented Moravian musts grown on integrated and organic vineyard*, připraveno k odeslání).

Počáteční koncentrace kvasinek stanovené u čerstvě vylisovaného moštu (viz grafy uvedené na obr. 1 A a B v příloze 2) byly téměř shodné u bílého vína odrůdy Sauvignon ekologicky i integrovaně ošetřené a pohybovaly se kolem $4,5 \log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($3,1\cdot 10^4 \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$). U červeného vína se počáteční hodnoty celkového počtu kvasinek lišily v rámci způsobu produkce vinné révy – u moštu z ekologicky ošetřených bobulí byla pozorována vyšší počáteční koncentrace kvasinek a to kolem $5 \log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ (na rozdíl od $4 \log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ u moštů odrůdy Rulandské modré integrovaně ošetřené). Jak již bylo několikrát zmíněno, počet kvasinek může být závislý na způsobu ošetření vinice, na odrůdě, stupni zralosti bobulí v čase sklizně nebo na klimatických podmínkách (Loureiro a Malfeito-Ferreira, 2003). Na základě získaných výsledků lze usuzovat, zda odlišný způsob ošetření vinice nemá až tak velký vliv na celkové zastoupení kvasinek. Kromě kvasinek pocházejících z bobulí do procesu ještě vstupují druhy/kmeny vyskytující se ve sklepě a na zařízeních používaných při lisování bobulí. Ve všech případech byl nejintenzivnější nárůst kultury pozorován v průběhu prvních 9 – 11 dnů fermentačního procesu. Maximální počty se pohybovaly v rozmezí 9 – 10 $\log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. Mezi červeným a bílým vínem byly pozorovány rozdíly v průběhu růstové křivky (obr. 1A a B příloha 2). U moštů Sauvignon byl sledován mírný nárůst kvasinek po jedenáctém dnu, kdežto u červeného vína nastal v průběhu kvašení po dosažení maxima mírný pokles. U bílého vína pocházejícího z ekologicky ošetřené vinice byly počty vyšší v porovnání s moštem získaným z integrovaně produkovaných bobulí. Na druhou stranu u červeného vína se vyšší hodnoty počtu kvasinek pohybovaly u fermentovaného moštu připraveného z integrovaně ošetřených bobulí.

Pro zjištění dalších rozdílů v kvasinkové populaci během fermentačního procesu výroby červeného a bílého vína připravovaného z odlišně pěstovaných bobulí, bylo stanoveno i relativní zastoupení kvasinkových druhů. Jednotlivé kvasinky byly seskupeny podle morfologických znaků kolonie a spočteny. Vždy jeden vzorek z morfologicky odlišné skupiny (celkem 51) byl identifikován metodou ITS-PCR-RFLP a bylo stanoveno relativní zastoupení identifikovaných druhů v závislosti na typu vína, ošetření bobulí a dnu fermentace. Výsledky jsou souhrnně uvedeny v příloze 2 v tabulkách 1 a 2.

Relativní zastoupení druhů bylo statisticky vyhodnoceno. Porovnáním relativních zastoupení jednotlivých izolovaných druhů kvasinek pro jednotlivé dny fermentace daného moštu a způsobu ošetření odrůdy, byl stanoven regresní korelační koeficient (R^2) charakterizující míru podobnosti dvou souborů dat. Korelační koeficienty stanovené na základě odlišnosti v relativním zastoupení izolovaných druhů v daném dnu odběru byly vyneseny do grafu zvlášť pro červené a bílé víno. **Graf 1** ukazuje rozdíly druhového zastoupení v rámci použitých agrotechnik (integrovaná, ekologická). Z grafu je patrné, že jak u červeného, tak i u bílého vína byla počáteční hodnota regresního koeficientu (R^2) přibližně stejná a to 0,8, což poukazuje na mírnou shodu mezi vlivem použité agrotechniky. Nečekané významné rozdíly byly patrné v průběhu kvasného procesu, kdy ihned po započatí fermentace začaly hodnoty R^2 prudce klesat. Poté, co fermentaci přebraly kmeny rodu *Saccharomyces*, R^2 se začalo zvyšovat a posléze dosáhlo hodnot kolem 1, což ukazuje na téměř identický systém.



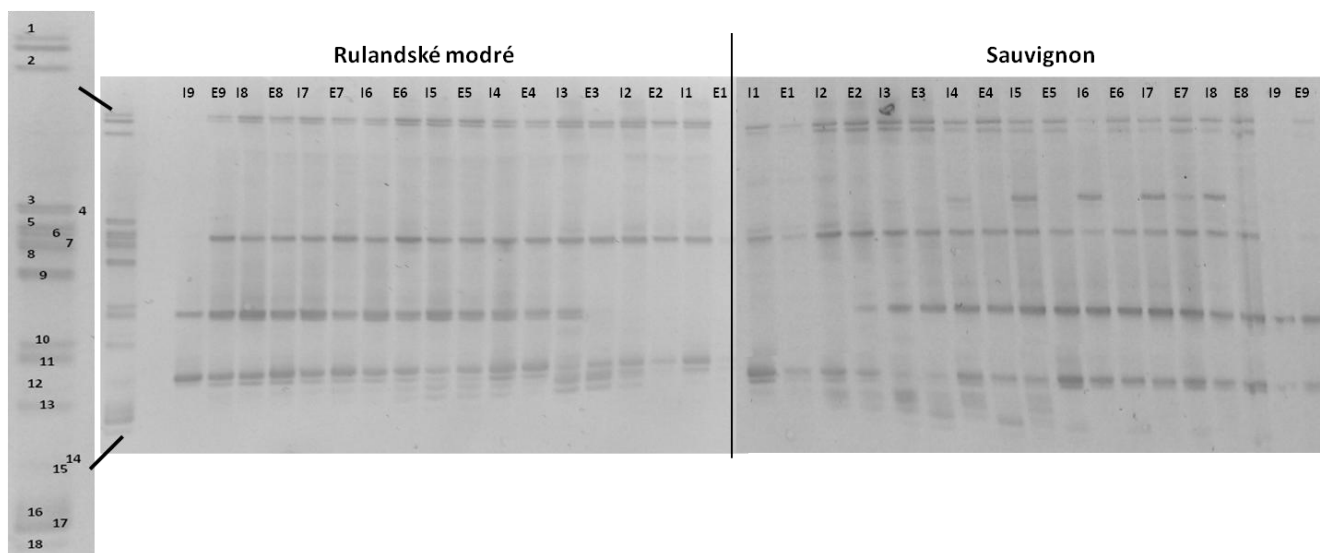
Graf 1: Závislost korelačního koeficientu (R^2) mezi vínem připraveným z integrovaně a ekologicky ošetřených bobulí. Korelační koeficienty byly získány z relativního zastoupení jednotlivých druhů kvasinek pro daný den odběru příslušného moštu.

Rozdíly mezi kvasinkovou populací v rámci odrůdy s rozdílem použité agrotechniky byly patrné při statistickém zhodnocení relativního zastoupení jednotlivých druhů. Pokles R^2 pozorovaný mezi integrovanou a ekologickou vinicí by mohl být zapříčiněn např. odlišným kmenovým zastoupením, jinými podmínkami (složkami) v moštu, ale i jiným zastoupením druhů z důvodu odlišného ošetření bobulí apod.

4.1.2.4 Přímá analýza kvasinkové populace

Populace kvasinek byla studována i za použití kultivačně nezávislé PCR-DGGE. Ze vzorku byla DNA izolována přímo bez předchozí kultivace a amplifikována univerzálními eukaryotickými primery. Získané amplikony byly děleny v akrylamidovém gelu s rostoucím denaturačním gradientem (LSU-DGGE). Získané DGGE profily amplifikovaných oblastí kvasinek jsou na **obr. 12**. Srovnání profilů populace kvasinek v závislosti na odběru, odrůdě a dané produkci je uvedeno v rámci dendrogramů na **obr. 13**.

Jednotlivé profily amplifikované rozdělené DNA byly zařazeny za použití délkového standardu, který byl připraven z předem sekvenovaných druhů uvedených v příloze 6, v tab. 4. Z DGGE gelů je patrná dominance druhů *H. uvarum* a *S. cerevisiae*. Druh *S. cerevisiae* nebyl detekován v prvních dnech fermentačního procesu (stejně jako v případě kultivačně závislé metody). Některé pásy byly velmi slabé intenzity, což poukazuje na nízkou koncentraci buněk v moštu.

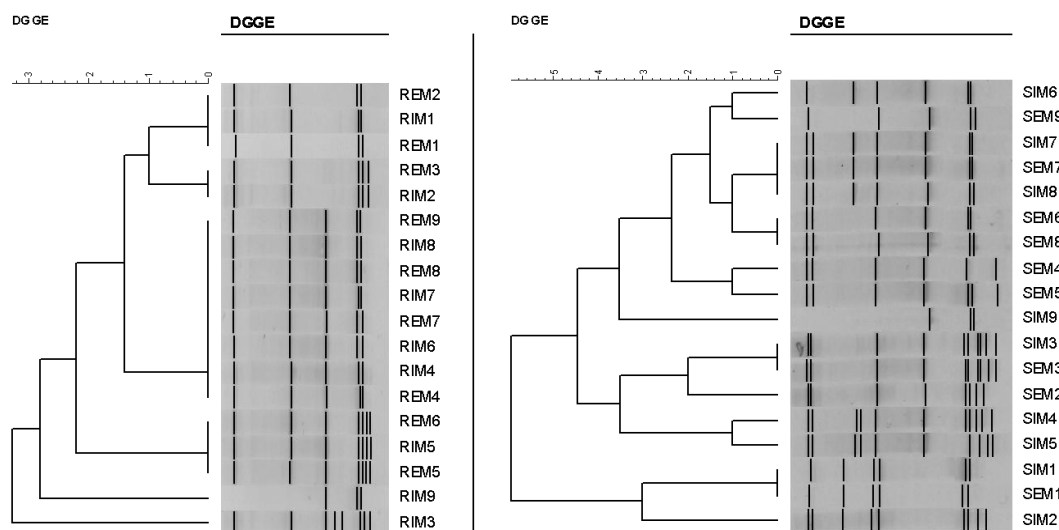


Obr. 12: DGGE profily získané amplifikací oblasti D1/D2 LSU přímo izolované templátové rDNA. Profily byly vyhodnoceny v programu BioNumerics – výsledné dendrogramy jsou uvedeny na **obr. 13**. Jednotlivé zóny délkového standardu: 1 – *H. uvarum*; 2 – *C. pararugosa*; 3 – *C. zemlinina*; 4 – *Sp. roseus*; 5 – *H. osmophila*; 6 – *H. vineae*; 7 – *T. delbrueckii*; 8 – *Cr. flavescens*; 9 – *C. vineae*; 10 – *R. glutinis*, *R. mucilaginosa*; 11 – *S. cerevisiae*; 12 – *M. pulcherrima*; 13 – *C. ethanolica*; 14 – *C. valida*; 15 – *I. occidentalis*; 16 – *I. orientalis*; 17 – *P. kluyveri*, *P. fermentans*; 18 – *P. membranifaciens*.

Profily byly vyhodnoceny a srovnány statisticky za použití programu BioNumerics. Výsledkem jsou dendrogramy (**obr. 13**), které ukazují podobnost kvasinkové populace vyskytující se v jednotlivých fázích kvasného procesu.

Výsledky DGGE analýzy mohou být ovlivněny řadou faktorů, jako je např. detekce mrtvých buněk a to zejména v posledních fázích fermentačního procesu (např. druh *H. uvarum*, **obr. 12**). Navíc jak uvádí Prakitichaiwattana et al. (2004) a Cocolin et al. (2013) limit detekce metody je vyšší než u kultivačně závislých metod a výsledky mohly být taktéž ovlivněny převahou (výraznou dominancí) některých druhů (upřednostňování templátu při PCR apod.). Proto je vhodné použít kombinaci obou přístupů a to jak metod, které jsou závislé na kultivaci mikroorganismů, tak i metod nezávislých na předchozí kultivaci. Nicméně, tato prvotní studie vyžaduje ještě další kroky, jako je např.

sekvenace jednotlivých zón, které byly v této práci srovnány pouze s délkovým standardem sbírkových kmenů.



Obr. 13: Vyhodnocení DGGE profilů amplifikované LSU rDNA kvasinek na základě počtu odlišných fragmentů u jednotlivých analyzovaných moštů. (REM, RIM – Rulandské modré; SIM, SEM – Sauvignon)

4.2 Identifikace, testování, výběr a použití autochtonního kmene při výrobě vína

Nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími kvalitu a originalitu vína jsou surovina a technologie, jejíž součástí je v dnešní době volba a aplikace čisté startovací kultury. Fermentace vinného moštu je klíčovým procesem, při kterém mohou vinaři ovlivňovat charakter vína aplikací startovacích kultur (Fleet, 2008). Romano et al. (2003) uvádí, že použití startovacích kultur při výrobě vína snižuje risk jeho znehodnocení a pomáhá předcházet nepředvídatelným změnám v chuti vína, které mohou být způsobeny spontánní fermentací. Komerčně dostupné kmeny (aktivní sušené kvasinky) jsou však izolovány ze zahraničních vinic a jejich aplikace při produkci moravských vín ovlivňuje originalitu produktu. V současné době je pozornost upřena na zachování autenticity a zároveň i kvality vína díky aplikaci kmenů kvasinek, které pocházejí ze stejné lokality jako hrozny použité k přípravě daného vína. Použití kmenů izolovaných z vlastních vinic, s definovanými vyhovujícími technologickými vlastnostmi, pomáhá proces regulovat, stejně jako v případě použití komerčně dostupné kultury a navíc zachovává již zmiňovanou autenticitu vín. Taktéž použití izolovaných kmenů může ve výsledku potlačit uniformitu vín zapříčiněnou inokulací moštu komerčně dostupnými kmeny (Ranieri a Pretorius, 2000; Fleet, 2008; Comitini et al., 2011).

Předpokladem selekce kultur kvasinek je **izolace a identifikace** čistých kmenů *S. cerevisiae*, **testování kmenů** a následné **ověření** kmene s vhodnými vlastnostmi v praxi. Tato část práce je tedy zaměřena na druhovou identifikaci izolovaných kvasinek rodu *Saccharomyces* a molekulární typizaci kmenů *S. cerevisiae* (nalezení vhodné identifikační metody). Taktéž se zabývá testováním kmenů na vhodné oenologické neboli technologické vlastnosti a aplikací vybraného autochtonního kmene v průmyslu, tedy během produkce tradičních moravských vín.

4.2.1 Druhová a kmenová identifikace sbírkových kmenů rodu *Saccharomyces*

Před samotnou aplikací autochtonních kmenů v procesu fermentace (viz kapitola 4.2.4) bylo nezbytné izolované čisté kultury *S. cerevisiae* identifikovat až na kmenovou úroveň. Tato část byla zaměřena na nalezení a zavedení metody, která by byla vhodná pro kmenovou identifikaci izolovaných autochtonních druhů *S. cerevisiae*.

Pro zavedení identifikačních technik byly použity sbírkové kmeny pocházející ze sbírky kvasinek CCY Bratislava. Použity byly následující kmeny: *S. cerevisiae* (20 kmenů), *S. bayanus* (8 kmenů), *S. pastorianus* (5 kmenů), *S. paradoxus* (2 kmeny), *S. kudriavzevii* (2 kmeny), *S. mikatae* (1 kmen). Navíc byl analyzován jeden hybridní kmen *S. bayanus/S. pastorianus* a kmeny nespádající do komplexu *Saccharomyces sensu stricto* a to *S. exiguus* (2 kmeny), *S. kluyveri* (1 kmen), *S. wickerhamii* (1 kmen). Seznam použitých typových kmenů, které sloužily jako porovnávací kmeny pro izolované vzorky a jako testovací kmeny pro zavedení relativně rychlých a nenákladných metod identifikace společně se zdrojem jejich izolace je uveden v příloze 6 v tab. 1.

Jak již bylo popsáno dříve v rámci kapitoly 2.4.1.2, některé druhy rodu *Saccharomyces* náleží do komplexu *Saccharomyces sensu stricto*. Do tohoto komplexu se řadí kmeny, které hrají významnou úlohu ve fermentačním průmyslu, zejména během produkce fermentovaných potravin a nápojů (Naumov et al., 2000; de Melo Pereira et al., 2010). Nejvýznamnějšími druhy, které se řadí do tohoto komplexu a účastní se procesu výroby vína, jsou *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. Navíc fermentace vinného moštu na víno je zprostředkována různými kmeny *S. cerevisiae*, které hrají důležitou úlohu při tvorbě charakteru finálního produktu (Mercado et al., 2010). Diverzita těchto kmenů, přítomných při spontánní fermentaci, přispívá k výsledné sensorické kvalitě produktu díky produkci specifických sensoricky aktivních sloučenin (Le Jeune et al., 2006). Proto je taktéž jejich identifikace v kvasném průmyslu považována za důležitou. Druhy komplexu *Saccharomyces sensu stricto* jsou si však velmi podobné (fylogeneticky příbuzné) a je těžké je odlišit fyziologickými a morfologickými testy, neboť jak uvádí Rainieri et al. (2003), nelze nikdy dosáhnout jednoznačného druhového odlišení. Proto byla a je identifikace druhů a kmenů komplexu *Saccharomyces sensu stricto* vždy složitým úkolem, zejména pak za použití již zmiňovaných fyziologických testů. Problémy s identifikací vedly k vývoji a aplikaci metod založených na molekulární biologii (Rainieri et al., 2003; Muir et al., 2011).

Aplikace molekulárních metod, které nejsou ovlivňovány kultivačním prostředím a závisí pouze na analýze DNA, jsou v současné době nezbytnou součástí klasifikace kvasinek. Byla tedy použita řada metod zahrnujících PCR-RFLP, dále PCR-fingerprinting (rep-PCR a RAPD), LSU-DGGE, druhově specifické primery. Pro kmenovou identifikaci druhu *S. cerevisiae* byla volena amplifikace delta oblastí genomové DNA (tzv. interdelta polymorfismus). Jednotlivé elektroforeogramy byly vyhodnoceny v programu BioNumerics 6.5. Použité metody, primery a jejich sekvence jsou shrnuty v **tab. 17**. Výsledky jednotlivých analýz jsou podrobně popsány v textu níže a souhrnně uvedeny v **tab. 19** a **20** v rámci kapitoly 4.2.1.6.

Tab. 17: Souhrn použitých metod, primery, jejich sekvence a hybridizační teploty. Teplotní a časové profily reakcí jsou uvedeny v tabulce 2 a 3 v příloze 6.

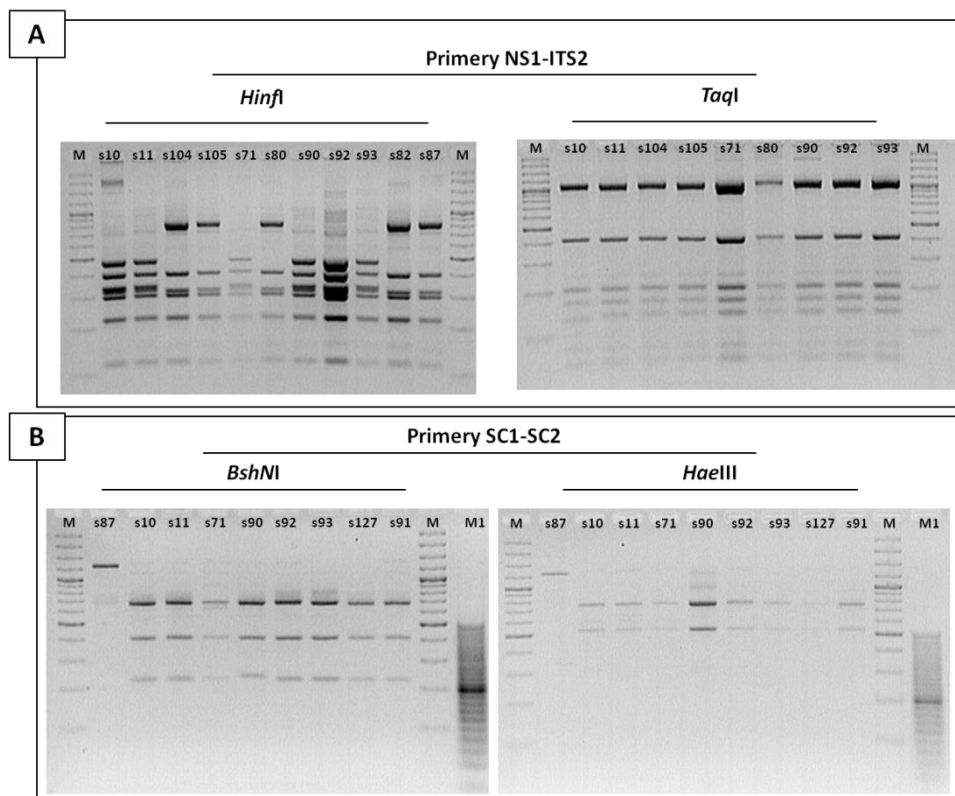
Metoda	Primer	Sekvence primeru (5' → 3')	Hybridizace T (°C)	Zdroj
PCR-RFLP Oblast ITS rDNA	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	48	Esteve-Zarzoso et al., (1999)
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		
PCR-RFLP Oblast NTS2-ITS	SC1	AAC GGT GCT TTC TGG TAG	50	Sabaté et al. (2000)
	SC2	TGT CTT CAA CTG CTT T		
PCR-RFLP Oblast ITS1+18S rDNA	NS1	GTA GGT AGT CAT ATG CTT GTC TC	58	White et al. (1990) Smole-Možina et al. (1997)
	ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT C		
Interdelta-PCR Oblast delta sekvencí	δ1	CAA AAT TCA CCT ATA TTC TCA	49	Legras a Karst (2003) Le Jeune et al. (2006)
	δ2	GTG GAT TTT TAT TCC AAC A		
	δ12	TCA ACA ATG GAA TCC CAA C	49	
	δ2	GTG GAT TTT TAT TCC AAC A		
Druhově specifické primery Multiplexní PCR Touchdown PCR	ScerF2	GCG CTT TAC ATT CAG ATC CCG AG	55	Muir et al. (2011)
	ScerR2	TAA GTT GGT TGT CAG CAA GAT TG		
	SbayF1	GCT GAC TGC TGC TGC TGC CCC CG		
	SbayR1	TGT TAT GAG TAC TTG GTT TGT CG		
	SparF7	CTT TCT ACC CCT TCT CCA TGT TGC		
	SparR7	CAA TTT CAG GGC GTT GTC CAA CAG		
	SkudF2	ATC TAT AAC AAA CCG CCA AGG GAG		
	SkudR1	CGT AAC CTA CCT ATA TGA GGG CCT		
LSU-DGGE D1/D2 26S rDNA	NL1(GC)	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC	52	Cocolin et al. (2000)
	LS2	ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC		
rep-PCR	(GAC) ₅	GAC GAC GAC GAC GAC	55	da Silva-Filho et al. (2005) dos Santos et al. (2007)
	(GTG) ₅	GTG GTG GTG GTG GTG		
	(GAG) ₅	GAG GAG GAG GAG GAG		
rep-PCR/RAPD	M13	GAG GGT GGC GGT TCT	50/36	da Silva-Filho et al. (2005)
parciální ITS sekvenace	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	52	White et al. (1990) O'Donnell (1993)
	NL4	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G		

4.2.1.1 PCR-RFLP

První aplikovanou metodou byla metoda PCR-RFLP. Analyzovány byly sbírkové kmeny uvedené v příloze 6 v tab. 1. Za účelem amplifikace vybraných oblastí rDNA kvasinek byly voleny tři páry primerů (ITS1-ITS4; SC1-SC2; NS1-ITS2).

Amplifikací oblasti ITS rDNA za použití primerů ITS1-ITS4 byl fragment dlouhý 880 bp; amplifikací primery SC1-SC2 1400 bp a za použití primerů NS1-ITS2 byl amplikon dlouhý 2000 bp. Amplifikovaná DNA všech identifikovaných druhů ukazovala vždy stejný počet bp (bez jakýchkoli odlišností ve velikosti fragmentu mezi analyzovanými druhy). Za účelem druhového zařazení byla volena metoda stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů, tzv. restriční analýza (RFLP). Použity byly následující restriční endonukleázy – *HaellI*, *HinfI*, *TaqI*, *AluI*, *MseI*, *HpaII*, *HhaI*, *BshNI*, *AvaI*, *RsaI*.

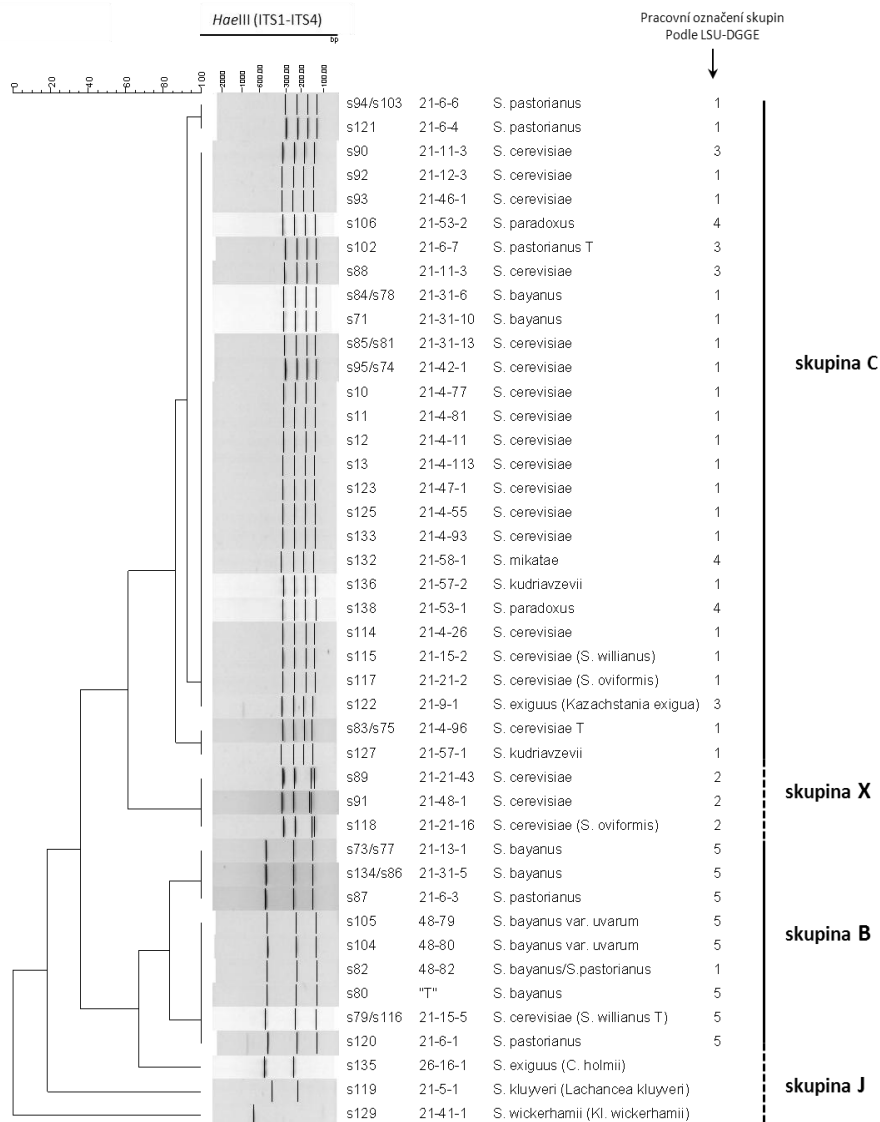
Všechny analyzované sbírkové kmeny, jejichž DNA byla amplifikována primery SC1-SC2 a NS1-ITS2 a amplikon byl posléze štěpen za použití výše zmíněných restriktáz, byly rozděleny pouze do dvou skupin s pracovním označením C a B. Oba páry primerů se proto ukázaly být nevhodné k druhové identifikaci. Ukázky elektroforeogramů restriční analýzy po amplifikaci primery SC1-SC2 a NS1-ITS2 jsou na obr. 14.



Obr. 14: Ukázka restričního štěpení amplifikované oblasti rDNA za použití primerů **(A)** NS1-ITS2 a **(B)** SC1-SC2 pro vybrané vzorky. Po stranách vyneseny délkový standard 100 bp (M) a délkový standard 20 bp (M1).

Po amplifikaci primery ITS1-ITS4 a štěpením amplikonu enzymem *HaeIII*, který jako jediný z použitých již zmíněných restriktáz dokázal odlišit více než jednu skupinu, byly analyzované vzorky rozděleny do 3 skupin s pracovním označením C, B, X. Další analyzované druhy *S. exiguus* CCY 26-16-1, *S. kluyveri* CCY 21-5-1 a *S. wickerhamii* CCY 21-41-1 jsou podle našich výsledků snadno odlišitelné od ostatních druhů (štěpením oblasti 5,8S ITS rDNA restriktázou *HaeIII*) a představují čtvrtou skupinu s pracovním označením J. Výsledky ITS-PCR-RFLP analýzy jsou souhrnně uvedeny v rámci dendrogramu na **obr. 15**.

Metoda ITS-PCR-RFLP je v literatuře popisována jako vhodná metoda pro identifikaci kvasinek izolovaných z různých potravinových matric (Querol a Fleet, 2006; Le Jeune et al., 2006). Nicméně je v případě druhové identifikace rodu *Saccharomyces* vhodná pouze k odlišení tohoto rodu od jiných nesaccharomycetních kvasinkových rodů (na základě velikosti ITS-PCR amplikonu). Za účelem druhové identifikace rodu *Saccharomyces* bylo nutné hledat jiné metody.



Obr. 15: Dendrogram sestavený na základě výsledků ITS-PCR-RFLP analýzy sbírkových kmenů kvasinek a jejich rozdělení do skupin. Pracovní označení skupin 1 – 5 je rozdělení kmenů podle LSU-DGGE a bude popsáno v kapitole níže. Toto rozdělení je uvedeno pro lepší srovnání. Kmeny s pracovním označením s135, s119 a s129 tvořily na DGGE gelu samostatné profily odlišné od skupin 1 – 5.

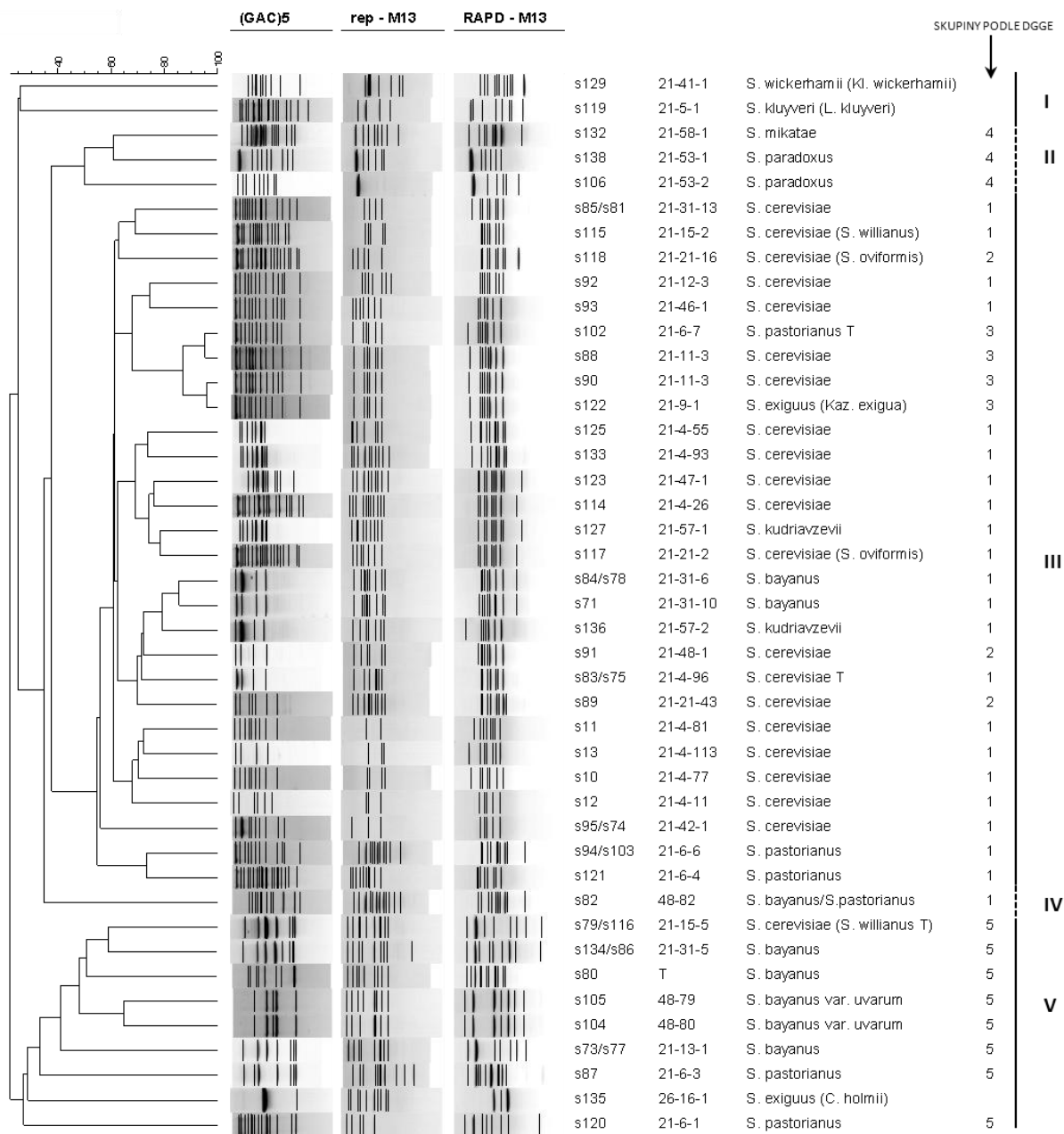
4.2.1.2 PCR-fingerprinting

Metoda PCR-fingerprinting se využívá k detekci hypervariabilních opakujících se DNA sekvencí. Tato metoda byla aplikována za účelem srovnání taxonomické příbuznosti mezi druhy rodu *Saccharomyces*. Použita byla metoda rep-PCR, která využívá oligonukleotidů krátkých opakujících se sekvencí (GAG)₅, (GTG)₅, (GAC)₅ a primer M13, který byl zároveň použit i v rámci metody RAPD. Nejlepšího odlišení bylo dosaženo použitím primerů (GAC)₅ a M13. Aplikací těchto metod a srovnáním fingerprintů v programu BioNumerics 6.5 byly analyzované kmeny rozděleny do pěti skupin. Výsledky jsou uvedeny v rámci dendrogramu na **obr. 16**.

Na základě výsledků analýz je možné konstatovat, že použité primery a zvolené amplifikační techniky seřadily testované kmeny do pěti skupin (**obr. 16**). *S. wickerhamii* (CCY 21-41-1) a *S. kluyveri* (CCY 21-5-1), které byly řazeny do skupiny J podle ITS-PCR-RFLP tvoří samostatnou skupinu.

S. exiguus (CCY 26-16-1) se podle výsledných fingerprintů podobá skupině 5. Vzorok skupiny III s pracovním označením s102, s88, s90, s122 ukázaly velmi vysokou genetickou podobnost.

Aplikace metody PCR-fingerprinting za použití výše zmíněných primerů vedla k lepšímu odlišení ve srovnání s metodou ITS-PCR-RFLP. Nicméně metody rep-PCR a RAPD neposkytly jednoznačnou druhovou a kmenovou míru odlišení rodu *Saccharomyces*; pouze seskupily dané kmeny na základě jejich genetické podobnosti. Navíc metody doprovází složitá interpretace dat (zejména při větším množství vzorků), která vyžaduje řadu zkušeností (slabé zóny na gelu apod.). Taktéž je nutné vzorky připravit v jedné sérii (tedy za použití stejné PCR směsi, jedné elektroforetické detekce), což je opět problémové při analýze většího množství vzorků, kde limitací je počet vzorků při elektroforetické detekci.



Obr. 16: Dendrogram sestavený na základě PCR-fingerprintů ukazující genetickou podobnost analyzovaných sbírkových kmenů.

4.2.1.3 Druhově specifické primery (multiplexní a touchdownová PCR)

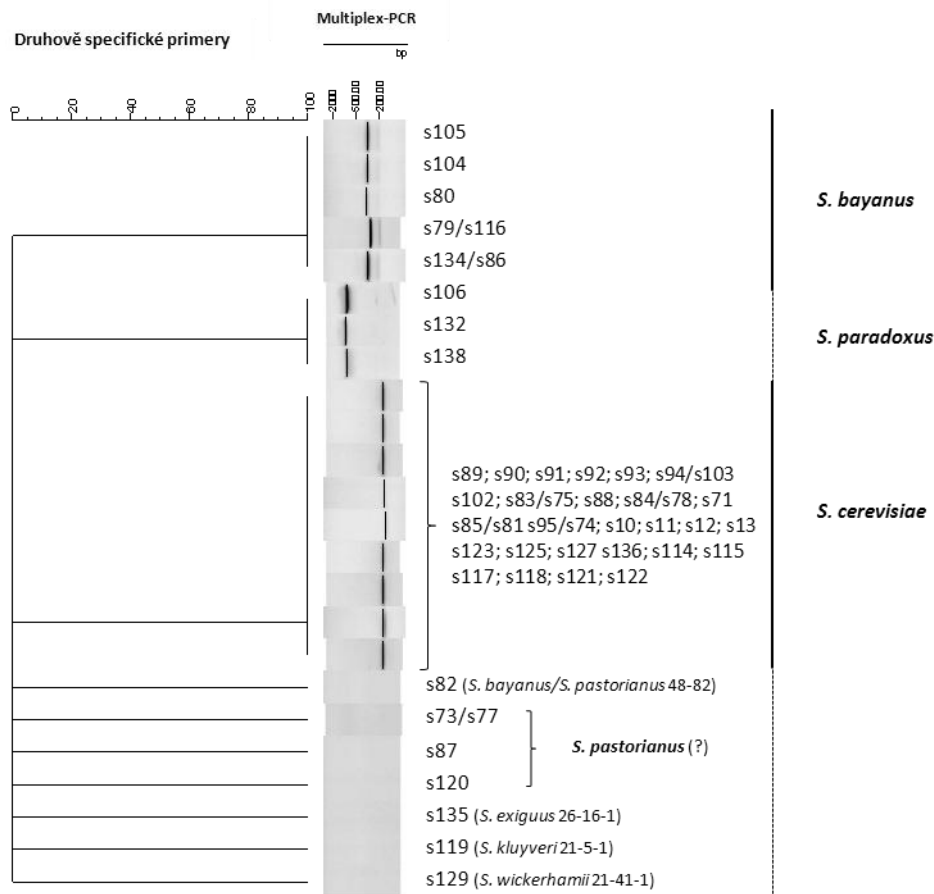
V roce 2011 Muir et al. navrhli druhově specifické primery a to za účelem identifikace druhů *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* a *S. arboricolus*. V rámci této práce byly použity 4 páry těchto druhově specifických primerů a to primery pro druh *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. kudriavzevii*. Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v **tab. 17** (str. 58). Použití druhově specifických primerů je založeno na strategii vzniku jednoho PCR produktu o známé velikosti odpovídající příslušnému druhu (viz **tab. 18**). Všechny výše zmíněné primery byly přidány do reakční směsi pro PCR a testovány proti genomové DNA všech analyzovaných vzorků (jako multiplexní PCR). Aby nedošlo k nespecifické amplifikaci spojené se vznikem nespecifických produktů, byla metoda provedena jako touchdownová PCR. Princip metody je založený na tom, že v prvních cyklech je nastavena vyšší hybridizační teplota než optimální hybridizační teplota zvolených primerů. Primery pak hybridizují méně efektivně, ale s vyšší přesností. V dalších krocích se teplota hybridizace snižuje, což zajistí dostatečnou koncentraci PCR produktu (Muir et al., 2011). Teplotní a časový profil reakce je uveden v příloze 6.

Tab. 18: Velikosti PCR produktů po amplifikaci DNA druhově specifickými primery; amplifikovaný gen a jeho charakteristika (Muir et al., 2011).

Druh (Primery)	Velikost PCR produktu (bp)	Amplifikovaný gen	Popis genu
<i>S. cerevisiae</i> (primery Scer F2, R2)	150	<i>mex67</i>	Zapojený v exportu mRNA
<i>S. bayanus</i> (primery Sbay F1, R1)	275	<i>dbp6</i>	Dead box protein 6
<i>S. kudriavzevii</i> (primery Skud F7, R7)	660	<i>pri1</i>	Polypeptid p48 DNA primázy
<i>S. paradoxus</i> (primery Spar F2, R1)	740	<i>sec31</i>	Zapojený v transportu proteinu z ER do Golgiho aparátu

Na základě výsledků touchdownové PCR za použití čtyř párů druhově specifických primerů byly analyzované kmeny identifikovány následovně: 28 kmenů bylo zařazeno jako *S. cerevisiae*, 5 testovaných kmenů bylo identifikováno jako *S. bayanus*, 3 analyzované vzorky jako *S. paradoxus*. Žádný kmen nebyl identifikován jako *S. kudriavzevii*. 7 kmenů, které nebyly za použití výše popsaných primerů amplifikovány, pravděpodobně patří mezi druhy *S. pastorianus* nebo *S. mikatae*. Pro identifikaci druhu *S. pastorianus* nebyly navrženy druhově specifické primery, neboť se jedná o přirozený hybrid druhů *S. cerevisiae* a *S. bayanus*. Výsledky jsou souhrnně uvedeny v **tab. 20** a ukázány v rámci dendrogramu na **obr. 17**.

Použití druhově specifických primerů je rychlé a vhodné k identifikaci některých druhů rodu *Saccharomyces*, jako je *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*. Nicméně identifikaci druhů *S. kudriavzevii* a *S. mikatae* za použití druhově specifických primerů bude nutné ještě dále testovat.

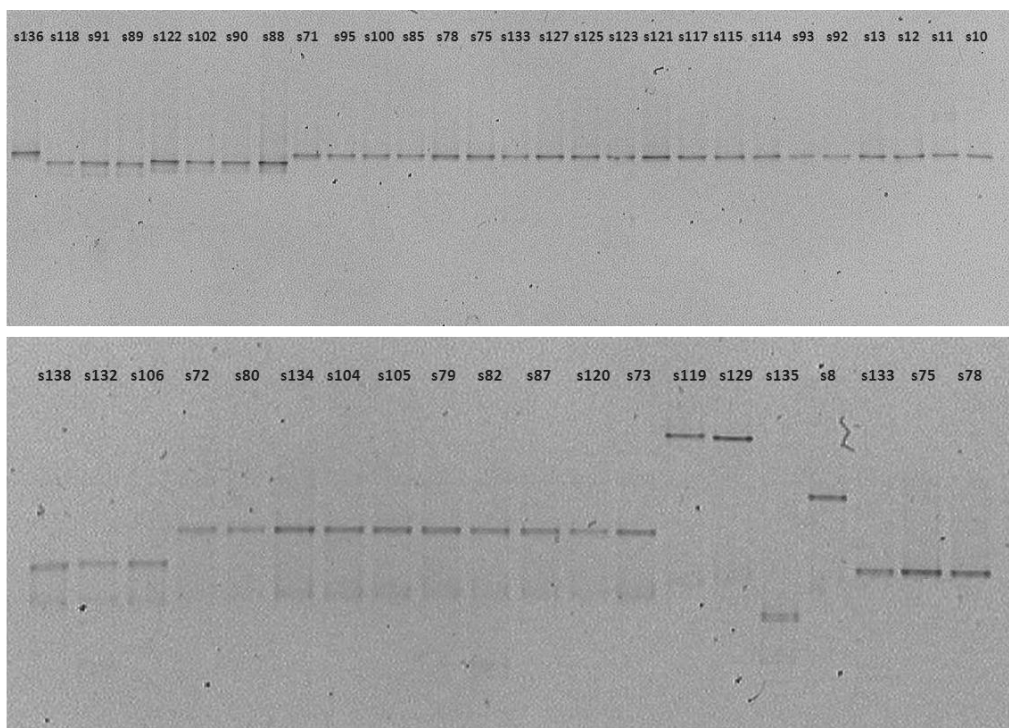


Obr. 17: Dendrogram sestavený na základě výsledků získaných amplifikací templátové DNA druhově specifickými primery za použití multiplexní PCR. Tři skupiny byly amplifikovány druhově specifickými primery a byly identifikovány jako *S. bayanus*, *S. cerevisiae* a *S. paradoxus*. 7 vzorků nebylo amplifikováno za použití druhově specifických primerů.

4.2.1.4 LSU-DGGE

Použité sbírkové kmeny byly analyzovány metodou denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). Metoda DGGE se často využívá ke studiu ekologie komplexních mikrobiálních ekosystémů (Cocolin et al., 2013). Díky tomu, že metoda je založena na separaci PCR amplikonů stejné velikosti na základě odlišností v sekvenci (Ercolini, 2004), byla daná metoda využita k seskupení sbírkových kmenů rodu *Saccharomyces*.

Za účelem amplifikace byla zvolena oblast D1/D2 LSU rDNA, která poskytuje stejný fragment po PCR pro všechny druhy rodu *Saccharomyces* (250 bp), taktéž bývá nejčastěji sekvenována a amplifikovaný úsek se nejčastěji využívá k DGGE analýze. Ukázky výsledných elektroforeogramů jsou uvedeny na **obr. 18**. Tímto způsobem byly sbírkové kmeny rozděleny do 5-ti skupin. Rozdělení do skupin se shodovalo s rozdělením po ITS-PCR-RFLP (viz kapitola 4.2.1.1) s tím rozdílem, že skupina C byla ještě dále dělena na 3 skupiny (1, 3, 4 – viz **tab. 20**). Kmeny s pracovním označením s119, s129 a s135, které se neřadí do komplexu *Saccharomyces sensu stricto*, byly odlišné od sebe i od ostatních kmenů (od skupin 1 – 5).



Obr. 18: Výsledný DGGE elektroforeogram detekce amplifikované oblasti D1/D2 LSU rDNA u použitých sbírkových kmenů dělených na základě rozdílných sekvencí. s8 – *Kluyveromyces lactis*.

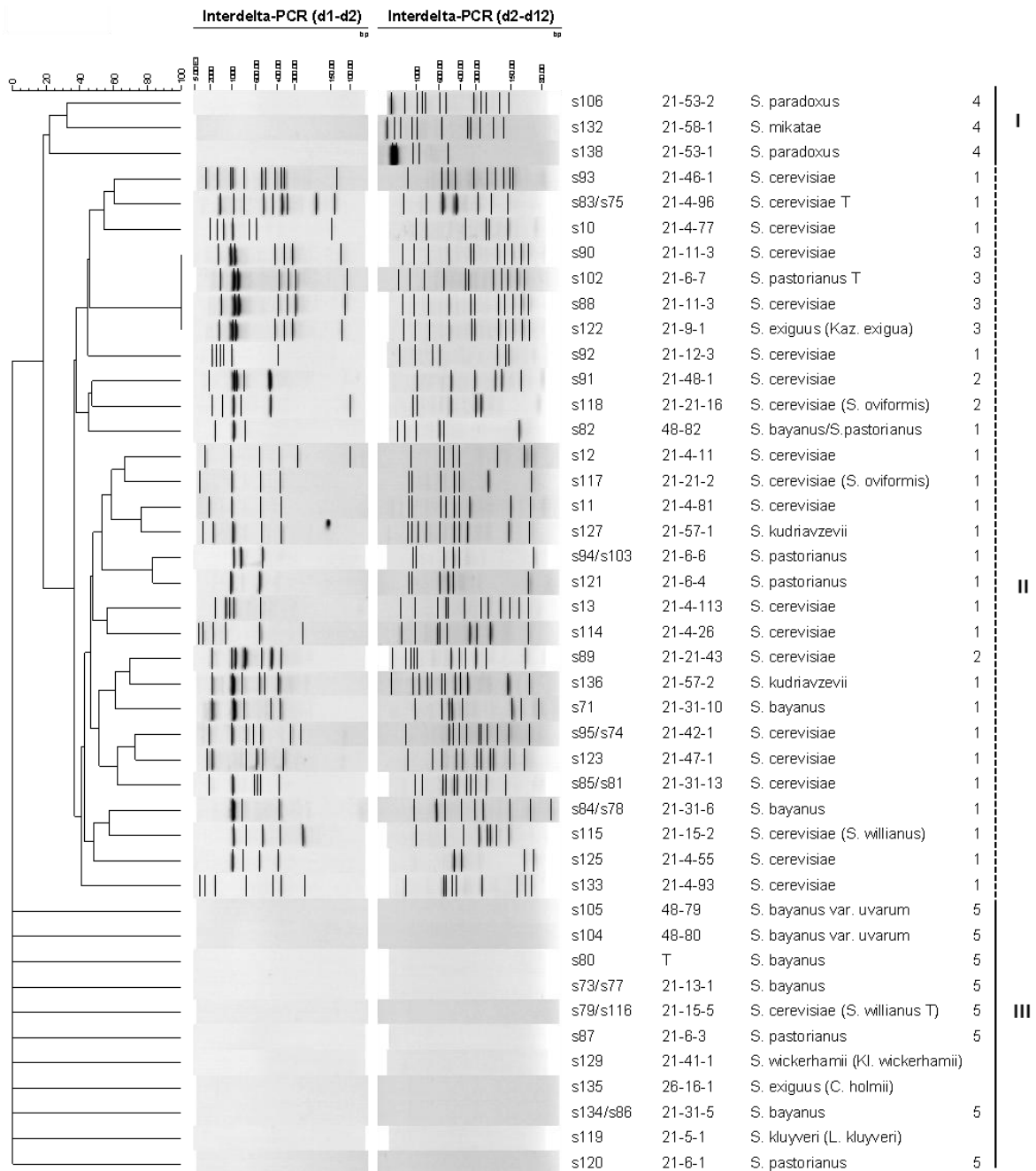
4.2.1.5 Interdelta polymorfismus – kmenová identifikace *S. cerevisiae*

Ke kmenové identifikaci izolovaných kmenů *S. cerevisiae* byly zvoleny primery $\delta 1$ - $\delta 2$ a $\delta 2$ - $\delta 12$ amplifikující delta oblasti rDNA druhu *S. cerevisiae*. Primery byly testovány na sbírkových kmenech rodu *Saccharomyces*. Delta oblasti jsou v literatuře popisovány jako vhodné genetické markery pro identifikaci polymorfizmů, protože jejich počet a lokalizace má intraspecifickou variabilitu (Franco-Duarte et al., 2011).

Ve srovnání s rep- a RAPD-PCR tato metoda vykazuje mnohem vyšší variabilitu mezi analyzovanými kmeny *S. cerevisiae*. Na základě získaných výsledků lze říci, že aplikované primery $\delta 1$ - $\delta 2$ jsou vhodné pro kmenové odlišení druhu *S. cerevisiae*. Tyto primery poskytly menší počet fragmentů než primery $\delta 2$ - $\delta 12$. Interpretace výsledků je v tomto případě snadnější. Navíc primery $\delta 1$ - $\delta 2$ amplifikovaly pouze kmeny spadající do skupin 1, 2, 3 (rozdělení podle LSU-DGGE) a neamplifikovaly DNA izolovanou z kvasinek skupiny 4 a 5 (taktéž podle LSU-DGGE), které taxonomicky odpovídají druhům *S. bayanus* a *S. paradoxus* (zařazení na základě výsledků amplifikace DNA druhově specifickými primery; viz kapitola 4.2.1.3). Primery $\delta 2$ - $\delta 12$ poskytovaly větší množství fragmentů po PCR a některé fragmenty byly velmi nízké intenzity. Navíc tento pár primerů kromě DNA druhu *S. cerevisiae* amplifikoval i DNA druhu *S. paradoxus*. Amplifikací delta oblastí rDNA druhu *S. bayanus* nebyl za použití obou párů primerů generován žádný fragment. Výsledné fingerprinty, stejně jako v předchozích případech, byly vyhodnoceny v programu BioNumerics 6.5. Výsledný dendrogram ukazující podobnost sbírkových kmenů je uveden na **obr. 19**. Některé kmeny, zařazené klasickou taxonomií jako kmeny rozdílné, jsou po molekulární kmenové typizaci za použití obou párů primerů shodné (sk. 3 podle LSU-DGGE; vzorky s pracovním označením s90, s 102, s 88 a s122).

Metoda amplifikace delta sekvencí je relativně snadno aplikovatelná, finančně a časově ne příliš náročná a zdá se být vhodná k identifikaci většího počtu vzorků. Primery $\delta 1$ - $\delta 2$ se ukázaly být

vhodnější ke kmenové identifikaci druhu *S. cerevisiae* než testovaný pár primerů $\delta 2$ - $\delta 12$ a než výše popsané metody rep- a RAPD-PCR. Metoda taktéž poskytuje dostatečnou míru kmenového odlišení druhu *S. cerevisiae*.



Obr. 19: Kmenová podobnost identifikovaných sbírkových kmenů (dendrogram sestavený na základě UPGMA klastrové analýzy). DNA některých kmenů neposkytuje po amplifikaci delta primery žádné amplikony z důvodu absence delta sekvencí, které se vyskytují u druhu *S. cerevisiae*.

4.2.1.6 Souhrn a zhodnocení aplikovaných identifikačních technik

K tomu, aby bylo možné průmyslově aplikovat vybrané autochtonní kmeny *S. cerevisiae*, bylo důležité nalézt vhodnou metodu odlišení rodu *Saccharomyces* od nesaccharomycetních kmenů a metodu kmenové identifikace druhu *S. cerevisiae*, která by byla rychlá, relativně nenáročná jak časově, tak laboratorně, a jejíž výsledky by byly snadno reprodukovatelné a interpretovatelné. Nicméně najít vhodnou metodu identifikace druhů rodu *Saccharomyces* není obecně snadný úkol, protože průmyslově používané kmeny rodu *Saccharomyces* spadají do komplexu *Saccharomyces sensu stricto* a jak již bylo řečeno, biologická příbuznost činí druhovou identifikaci kmenů komplexu velmi obtížnou. Byla tedy využita řada molekulárních typizačních metod, jejichž výhody a nevýhody jsou stručně charakterizovány v **tab. 19**.

Tab. 19: Použité metody – stručné zhodnocení.

METODA	POUŽITÝ PRIMER/Y	POZNÁMKA
PCR-RFLP	ITS1-ITS4	ITS-PCR-RFLP odlišení saccharomycetních a nesaccharomycetních druhů HaeIII – odlišení dvou skupin: <i>S. cerevisiae</i> a <i>S. bayanus</i>
PCR-fingerprinting (rep-PCR)	(GTG) ₅ (GAC) ₅ (GAG) ₅ M13 primer	Seskupení druhů do příslušné skupiny na základě genetické podobnosti Složitá reprodukovatelnost
PCR-fingerprinting (RAPD)	M13 primer	Složitá reprodukovatelnost
Touchdownová PCR	Druhově specifické primery	Vhodné pro druhovou identifikaci některých druhů komplexu <i>Saccharomyces sensu stricto</i> , jako je <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>S. paradoxus</i>
Interdelta-PCR	δ1-δ2 δ2-δ12	Identifikace kmenů <i>S. cerevisiae</i> ; jiné druhy nejsou amplifikovány kvůli absenci delta oblastí δ2-δ12 v porovnání s δ1-δ2 amplifikuje i druh <i>S. paradoxus</i> , interpretace dat je složitější z důvodu generace většího množství slabých fragment
LSU-DGGE	NL1(GC)-LS2	Pouze pro seskupení stejných druhů (pro identifikaci vzorky nutno sekvenovat nebo použít výše zmíněné metody)

Souhrnné výsledky molekulární typizace sbírkových kmenů, dříve identifikovaných pouze na základě fyziologických a morfologických charakteristik, jsou uvedeny v **tab. 20**. Odlišnosti v identifikaci s použitím fyziologických testů (v tabulce jsou zvýrazněny) mohou být způsobeny tím, že druhy komplexu *Saccharomyces sensu stricto* jsou si natolik podobné, že jejich identifikace fyziologickými testy je zřejmě v některých případech ne zcela jasná kvůli potenciální možnosti zkreslení dat kultivačními podmínkami. Navíc některé druhy jsou odlišitelné jen v rámci několika málo fyziologických charakteristik.

Kombinace výše zmíněných aplikovaných molekulárních metod umožnila rychlou, relativně jednoduchou a snadno opakovatelnou identifikaci kmenů *S. cerevisiae*. Některé studie (Schuller et al., 2004; Maqueda et al., 2010; Ortiz et al., 2013) uvádí aplikaci restriční analýzy mitochondriální DNA nebo karyotypizace za účelem odlišení různých kmenů *S. cerevisiae*. Tyto metody jsou laboratorně náročné jak z hlediska času, tak obtížnosti provedení metody a navíc výsledky jsou ovlivněny složitostí

interpretace dat kvůli velkému počtu vzniklých fragmentů po restrikční analýze mtDNA. Naopak testované metody založené na typizaci delta sekvencí za použití PCR jsou vhodné ke kmenové identifikaci a to díky rychlosti provedení, ne tak složité interpretaci dat a snadnější opakovatelnosti v porovnání např. s karyotypizací studovanou metodou PFGE. Autoři Schuller et al. (2004) uvádějí, že typizace delta sekvencí může odlišit druh až na kmenovou úroveň, stejně jako již zmiňované RFLP mtDNA a PFGE. Z tohoto důvodu mohou být aplikované molekulární techniky jednodušší a rychlou alternativou k doposud využívaným metodám RFLP mtDNA a PFGE.

Kombinace metod ITS-PCR-RFLP společně s využitím druhově specifických primerů pro druh *S. cerevisiae* a interdelta polymorfismus je výborným nástrojem kmenové identifikace druhu *S. cerevisiae*. Metoda ITS-PCR-RFLP odlišuje saccharomycetní kmeny od kmenů nesaccharomycetních již na základě velikosti amplikonu, tedy bez použití restrikčních endonukleáz. Amplifikace izolované DNA za použití specifického páru primeru pro druh *S. cerevisiae* umožňuje identifikovat a odlišit druhy rodu *Saccharomyces* (primery amplifikují pouze druh *S. cerevisiae*). Kmenová identifikace odlišných druhů *S. cerevisiae* pak může být provedena za použití páru primeru $\delta 1$ - $\delta 2$. Amplifikace DNA tímto párem primerů umožnila odlišit kmeny *S. cerevisiae* a metoda byla využita k odlišení izolovaných kmenů.

U vybraných kmenů (celkem 16) byla nakonec provedena sekvenace oblasti ITS a D1/D2 LSU rDNA (velikost amplikonu byla 1500 bp). Získané sekvence byly vyhodnoceny za použití databáze NCBI Blast. Nciméně z důvodu vysoké podobnosti sekvencí byly jednotlivé sekvenované kmeny zařazeny pouze jako *S. cerevisiae*.

Tab. 20: Souhrn použitých sbírkových kmenů identifikovaných fyziologickými testy a stručné vyhodnocení aplikovaných molekulárních metod.

Sk. č.	Prac.označ.	CCY	Fyziologické testy			Molekulární metody				
			Druh	PCR-RFLP ¹	ITS-PCR-RFLP ¹	LSU-DGGE ²	D-spec ³	d1-d2	d2-d12 ⁴	Druh
Sk. 1	s10	21-4-77	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s11	21-4-81	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s12	21-4-111	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s13	21-4-113	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s92	21-12-3	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s93	21-46-1	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s114	21-4-26	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s115	21-15-2	<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. willianus</i>)	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s117	21-21-2	<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. oviformis</i>)	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s121	21-6-4	<i>S. pastorianus</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s123	21-47-1	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s125	21-4-55	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s133	21-4-93	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	S75/s83	21-4-96	<i>S. cerevisiae</i> T	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	S78/s84	21-31-6	<i>S. bayanus</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	S81/s85	21-31-13	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	s94/s103	21-6-6	<i>S. pastorianus</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
	S95/s74	21-42-1	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>
s71	21-31-10	<i>S. bayanus</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>	
s136	21-57-2	<i>S. kudriavzevii</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>	
s127	21-57-1	<i>S. kudriavzevii</i>	C	C	1	SC	A	A	<i>S. cerevisiae</i>	
s82	48-82	<i>S. bayanus/S. pastorianus</i>	B	B	1	N	A	A	hybridní kmen	
Sk. 2	s89	21-21-43	<i>S. cerevisiae</i>	C	X	2	SC	A	A	?
	s91	21-48-1	<i>S. cerevisiae</i>	C	X	2	SC	A	A	?
	s118	21-21-16	<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. oviformis</i>)	C	X	2	SC	A	A	?
Sk. 3	s88	21-11-3	<i>S. bayanus</i>	C	C	3	SC	A	A	<i>S. pastorianus</i> ?
	s90	21-11-1	<i>S. cerevisiae</i>	C	C	3	SC	A	A	<i>S. pastorianus</i> ?
	s122	21-9-1	<i>S. exiguus</i> (<i>Kaz. exigua</i>)	C	C	3	SC	A	A	<i>S. pastorianus</i> ?
	s102	21-6-7	<i>S. pastorianus</i> T	C	C	3	SC	A	A	<i>S. pastorianus</i> ?
Sk. 4	s106	21-53-2	<i>S. paradoxus</i>	C	C	4	SPAR	N	A	<i>S. paradoxus</i>
	s132	21-58-1	<i>S. mikatae</i>	C	C	4	SPAR	N	A	<i>S. paradoxus</i>
	s138	21-53-1	<i>S. paradoxus</i>	C	C	4	SPAR	N	A	<i>S. paradoxus</i>
Sk. 5	s80	"T"	<i>S. bayanus</i>	B	B	5	SB	N	N	<i>S. bayanus</i>
	s86/s134	21-31-5	<i>S. bayanus</i>	B	B	5	SB	N	N	<i>S. bayanus</i>
	s87	21-6-3	<i>S. pastorianus</i>	B	B	5	N	N	N	<i>S. pastorianus</i>
	s104	48-80	<i>S. bayanus</i> var. <i>uvarum</i>	B	B	5	SB	N	N	<i>S. bayanus</i>
	s105	48-79	<i>S. bayanus</i> var. <i>uvarum</i>	B	B	5	SB	N	N	<i>S. bayanus</i>
	s120	21-6-1	<i>S. pastorianus</i>	B	B	5	N	N	N	<i>S. pastorianus</i>
	s73/s77	21-13-1	<i>S. bayanus</i>	B	B	5	N	N	N	<i>S. pastorianus</i>
s79/s116	21-15-5	<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. willianus</i> T)	B	B	5	SB	N	N	<i>S. bayanus</i>	
Sk. J	s129	21-41-1	<i>S. wickerhamii</i> (<i>Kl. wickerhamii</i>)	J	J	6	N	N	N	<i>S. wickerhamii</i>
	s119	21-5-1	<i>S. kluyveri</i> (<i>L. kluyveri</i>)	J	J	7	N	N	N	<i>S. kluyveri</i>
	s135	26-16-1	<i>S. exiguus</i> (<i>C. holmii</i>)	J	J	8	N	N	N	<i>S. exiguus</i>

¹ C, B, X, J – značí pracovní označení skupin

² 1 – 5 značí počet vytvořených skupin

³ SC – *S. cerevisiae*, SB – *S. bayanus*, SPAR – *S. paradoxus*. ? – druhově nezařazeno

⁴ A – amplifikuje, N - neamplifikuje

4.2.2 Identifikace izolovaných kmenů *S. cerevisiae*

V rámci předchozích kapitol byla popsána aplikace různých identifikačních metod s cílem najít metodu, která by byla vhodná k odlišení druhů komplexu *Saccharomyces sensu stricto* a ke kmenové identifikaci druhu *S. cerevisiae*. Některé tyto metody byly aplikovány za účelem identifikace izolovaných kmenů *S. cerevisiae*.

V průběhu let 2009 – 2011 bylo celkově izolováno a přečištěno 120 kmenů rodu *Saccharomyces*. Kvasinky byly izolovány ze spontánně kvašených moštů a bobulí odrůd uvedených v kapitole 4.1.2, tedy ze Sauvignonu a Rulandské modré, obojí pocházející z integrovaně a ekologicky ošetřené vinice. Souhrn počtu izolátů a zdroj jejich izolace je uveden v **tab. 21**.

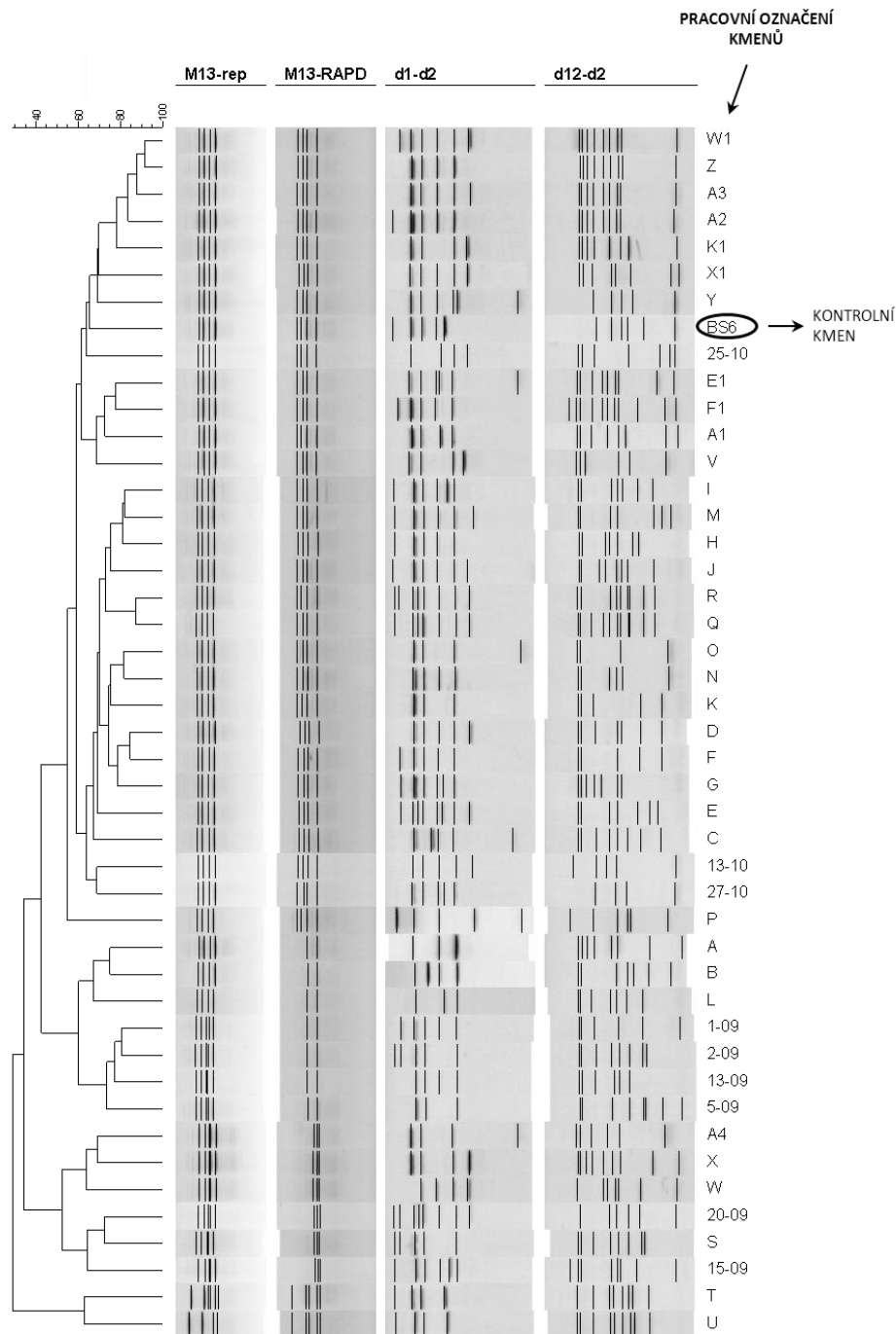
Tab. 21: Počet izolátů rodu *Saccharomyces sp.*

Odrůda	Ročník	Počet izolátů <i>Saccharomyces sp.</i>	
		Integrovaná	Ekologická
		Bobule/Mošť	Bobule/Mošť
Sauvignon	2009	1/14	1/11
Rulandské modré	2010	0/14	0/17
Sauvignon	2011	0/20	0/17
Rulandské modré	2011	1/14	0/10
Celkem			120

Kvasinky rodu *Saccharomyces* byly odlišeny od ostatních izolátů (od nesaccharomycetních kmenů) na základě velikosti amplikonu (amplifikací oblasti 5,8S ITS pomocí PCR), který je pro rod *Saccharomyces* dlouhý 880 bp. K druhové identifikaci byly použity druhově specifické primery pro druh *S. cerevisiae*. Velikost fragmentu po PCR byla 150 bp; jiné druhy rodu *Saccharomyces* neposkytují při amplifikaci rDNA za použití tohoto páru druhově specifických primerů žádný fragment (viz kapitola 4.2.1.3). Dále byl k charakterizaci použitý primer M13 v metodě rep- a RAPD-PCR. Ke kmenové charakterizaci byly použity primery $\delta 1$ - $\delta 2$. Aplikací tohoto páru primerů bylo získáno od tří do osmi odlišných fragmentů na kmen s jedním opakujícím se fragmentem o velikosti okolo 1000 bp. Na druhou stranu, pár primerů $\delta 2$ - $\delta 12$ poskytl značně více fragmentů v rámci jednoho vzorku a některé fragmenty byly velmi nízké intenzity. Malé množství fragmentů/vzorek je připisováno prokázané nízké podobnosti primerů $\delta 1$ - $\delta 2$ k sekvencím genomu *S. cerevisiae* (Xufre et al., 2011).

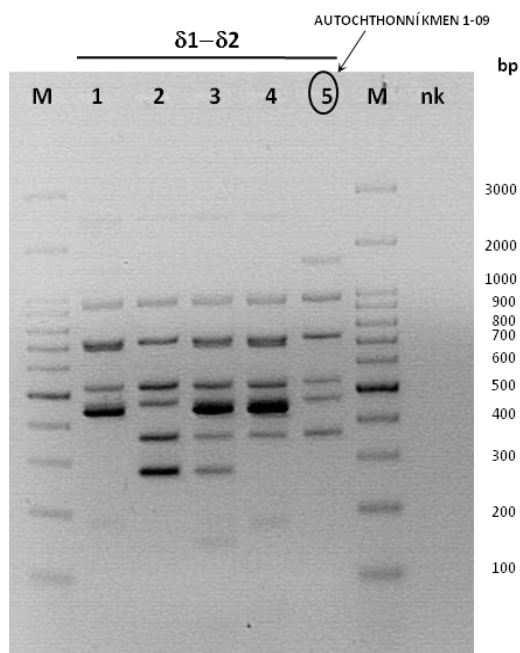
Všechny výsledné elektroforeogramy byly vyhodnoceny v programu BioNumerics 6.5. Dendrogram, sestavený na základě UPGMA analýzy a znázorňující genetickou podobnost identifikovaných kmenů *S. cerevisiae*, je na **obr. 20** společně s výslednými fingerprinty. Kombinací této dvojice páru delta primerů bylo odlišeno 45 různých kmenů *S. cerevisiae*. Za použití primeru M13 a metody rep-PCR byly izoláty rozděleny pouze do tří skupin, za použití RAPD techniky do čtyř skupin (**obr. 20**).

Většina izolátů a identifikovaných kmenů *S. cerevisiae* pocházela ze spontánně fermentovaných moštů. Jak již bylo řečeno, autoři Fleet et al., 2002; Raspor et al., 2006 aj. uvádějí, že je totiž složité izolovat populace rodu *Saccharomyces* z bobulí z důvodu jejich výskytu ve velmi nízké koncentraci ($> 10 - 100 \text{ CFU} \cdot \text{cm}^{-2}$) a to za použití standardních kultivačních technik. Nicméně inokulací bobulí v tekutém sladidovém médiu po dobu deseti dnů se podařilo izolovat tři kmeny rodu *Saccharomyces* (viz **tab. 21**).



Obr. 20: Dendrogram izolovaných kmenů *S. cerevisiae* založený na výsledných PCR-fingerprintech získaný amplifikací delta sekvencí a sestrojený na základě UPGMA klastrové analýzy. Zdroj izolace jednotlivých kmenů je uveden v tabulce rámci přílohy 3.

Současně byly identifikovány i komerčně dostupné kmeny (*S. cerevisiae* BS6; *S. cerevisiae* M1157; *S. cerevisiae*/*S. bayanus* s181; *S. cerevisiae*/*S. kudriavzevii* Challenge Ybes), které vinař také běžně používá k zakvášení moštů, autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09, který byl izolován v roce 2009 z ekologicky ošetřených bobulí odrůdy Sauvignon. Autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09 byl vybrán na základě vhodných technologických vlastností jako startovací kultura (viz kap. 4.2.3) a před samotnou aplikací v řízeném kvasném procesu byla srovnána jeho genetická podobnost s komerčně dostupnými výše zmíněnými kmeny (**obr. 21**).



Obr. 21: Výsledný elektroforeogram srovnání izolovaného kmene 1-09 s komerčními kmeny používanými v posledních letech v příslušném vinařství. Ke kmenové identifikaci byla využita metoda typizace delta sekvencí za použití primerů $\delta 1$ - $\delta 2$. 1 – kmen *S. cerevisiae* BS6; 2 – *S. cerevisiae* M1157 (Vitilevure C); 3 – *S. cerevisiae*/*S. bayanus* s181 (Challenge); 4 – *S. cerevisiae*/*S. kudriavzevii* (Challenge Ybes); 5 – autochtonní kmen 1-09. M – délkový standard 100 bp, jednotlivé zóny v markeru jsou popsány na pravé straně elektroforeogramu.

4.2.3 Screening oenologických vlastností vybraných izolovaných kmenů *S. cerevisiae*

Při aplikaci nových kmenů ve vinařství musí být stanovena řada kritérií, které zaručí, že selektované kmeny budou mít žádoucí technologické vlastnosti ovlivňující pozitivně výsledný charakter vína. Taktéž se kmeny musí adaptovat na různé stresové podmínky, neboť je obecně známo, že ne všechny kmeny mají schopnost adaptace vůči specifickým podmínkám moštu a vína. Proto bývá testována řada kritérií zahrnující alkoholovou toleranci, schopnost vysoké fermentační aktivity, růst při vyšších koncentracích sacharidů, rezistenci k SO_2 , nízkou produkci H_2S . Dále pak rezistence ke kilerovým toxinům a s tím spojená žádoucí pozitivní kilerová aktivita a schopnost flokulace (Nikolaou 2006; Comitini et al., 2011; Suárez-Lepe a Morata 2012; Ortiz et al., 2013). Všechna tato kritéria byla popsána v kapitole 2.4.1.4.

Výsledky izolace, identifikace a charakterizace kmenů byly shrnuty do článku Šuranská et al., *Identification of indigenous Saccharomyces cerevisiae strains isolated from Moravian wines and screening of their oenological properties for their potential application as the starter culture*, odesláno do tisku (viz příloha 3). Data, která nejsou součástí publikace, jsou uvedena kompletně v textu v této kapitole. Vybrané testované oenologické charakteristiky některých kmenů jsou uvedeny na **obr. 23**.

V rámci předchozích kapitol (4.2.1. a 4.2.2.) byly izolovány, přečištěny a identifikovány kmeny *S. cerevisiae*. Celkově bylo identifikováno 45 odlišných kmenů *S. cerevisiae* z celkového počtu 120 izolovaných kmenů rodu *Saccharomyces* (viz kapitola 4.2.2). U těchto kmenů byly testovány výše zmíněné oenologické (technologické) vlastnosti. Navíc byl testován i komerčně dostupný kmen *S. cerevisiae* BS6, který se ve vinařství běžně používá k zakvácení moštů, a který byl použitý jako kmen

kontrolní při testování nových kmenů. Tento kmen je podle výsledků kmenové typizace odlišný od kmenů izolovaných (**obr. 21**). Testovány pak byly následující vlastnosti: tolerance vůči ethanolu, osmotolerance, SO₂ tolerance, flokulace, utilizace kyseliny jablečné a octové, schopnost produkce kyseliny octové, H₂S produkce a testování vybrané glukosidázové enzymové aktivity a byla také stanovena killerová aktivita. Výsledky oenologických vlastností testovaných izolovaných kmenů jsou souhrnně uvedeny v příloze 3 v tab. 2.

Kmeny *S. cerevisiae* jsou v první řadě zodpovědné za fermentaci sacharidů a produkci alkoholu. Ideální kmeny by měly být schopné iniciovat a dokončit fermentaci. To vše souvisí s tzv. fermentační silou, tedy metabolismem sacharidů, která je spojena se schopností kmene odolávat stresu souvisejícím s fermentací moštu (Barrajón et al., 2011). Měřením zákalu byly stanoveny růstové křivky, z nichž byly vypočítány měrné růstové rychlosti (μ) (viz příloha 3, tab. 2). Testován byl potenciál kmenů růst za podmínek vysokého osmotického stresu, na který musí kvasinky, především kvůli vysoké počáteční koncentraci sacharidů, přizpůsobit svůj metabolismus hned v počátečních fázích kvašení. Schopnost odolávat osmotickému stresu byla testována v médiu s 40 a 50% glukózou. Obecně platí, že vysoká koncentrace sacharidů v moštu může inhibovat metabolismus kvasinek a vést (stejně jako v případě vyšší koncentrace ethanolu) k vleklé fermentaci (Ortiz et al., 2013). Všechny námi testované kmeny byly schopny růst v přítomnosti 40 a 50% glukózy. V přítomnosti 40% glukózy pouze 4 kmeny (W1, X, L a 1-09) ukázaly vyšší měrnou růstovou rychlost (μ) než kontrolní komerčně dostupný kmen *S. cerevisiae* BS6. Zajímavostí je, že většina testovaných kmenů (34) rostla lépe v 50% glukóze v porovnání s kontrolním kmenem BS6.

S procesem fermentace postupně narůstá koncentrace ethanolu. Aby kmeny mohly dokončit alkoholové kvašení, je nezbytné adaptovat se taktéž na vzrůstající koncentraci alkoholu. Hlavním místem toxického působení ethanolu vůči buňkám kvasinek je cytoplazmatická membrána, kde dochází ke změně organizace, permeability a následné inhibici glukózového transportu a tedy k poklesu fermentační rychlosti (Tofalo et al., 2009). To vše vede k již zmiňované vleklé fermentaci. Testována byla tedy schopnost kmenů růst ve 12, 14, 15, 16 a 17 obj. % ethanolu. 18 izolátů z celkového počtu 45 mělo lepší růst ve 12% ethanolu než kontrolní kmen BS6; 29 izolátů rostlo lépe v přítomnosti 14% ethanolu, 2 kmeny (A1, A3) nerostly ve 14% ethanolu vůbec. 4 kmeny (W, X1, 2-09 a 10-09) rostly v 16% ethanolu a žádný kmen (ani kontrolní) nerostl v přítomnosti 17% ethanolu. Kontrolní kmen *S. cerevisiae* BS6 prokázal nejvyšší toleranci v přítomnosti 14% ethanolu.

Při nižších koncentracích, jak v přítomnosti alkoholu (12, 14 %) tak i glukózy (40 %), je v porovnání s izoláty růst komerčního kmene BS6 dobrý, nicméně při vyšších koncentracích je schopnost kmene BS6 odolávat stresům nižší než u řady izolátů. To může být způsobeno mnoha faktory, zejména pak schopností kmene rychle se adaptovat na dané stresové podmínky. Taktéž odolnost k daným stresovým podmínkám je kmenově závislá. Kompletní výsledky osmo- a etanolové tolerance jsou uvedeny v tab. 2 v příloze 3.

Dále byla testována schopnost kmenů flokulovat. Flokulace je ve fermentačním průmyslu žádoucí, zejména při produkci vína, neboť představuje snadnou a levnou cestu oddělení buněk od fermentačního média. Nicméně je žádoucí, aby buňky přetrvávaly v prokvašeném moštu ve formě suspenze do té doby, dokud nebude dokončen kvasný proces a až posléze sedimentovaly (Janderová a Bendová, 1999). Výsledky flokulačního testu (hodnoceny vizuálně na základě shlukování buněk a sedimentace) ukázaly, že 91 % izolovaných kmenů je schopno setrvat v klidu v suspenzi po dobu delší než 10 minut. Naopak kmen *S. cerevisiae* B ukázal silnou flokulační schopnost, což se projevilo i při kultivaci kmene v běžném tekutém sladidlovém médiu, kdy buňky nebyly rovnoměrně rozdělovány v médiu, nýbrž tvořily shluky v podobě pravidelných geometrických tvarů (disků,

kuliček, tyčinek) (viz **obr. 23**). Flokulace je obecně ovlivněna chemickým složením média (pH, dvojmocné ionty), podmínkami fermentace (O_2 , sacharidy, teplotou růstu a koncentrací alkoholu) a zejména pak intenzitou exprese genů zapojených do procesu flokulace (*flo1*, *Lg flo1*, *flo5*, *flo8*, *flo9* a *flo10*). Proces flokulace je kmenově závislý (Soares, 2010).

Většina kvasinek je senzitivní k vyšším koncentracím SO_2 , který bývá v procesu používán jako antioxidant a antimikrobiální činidlo. Kmeny pro technologickou aplikaci by měly být odolné a růst i při vyšších koncentracích SO_2 . Všechny analyzované kmeny byly tolerantní k SO_2 což dokazoval nárůst kultury do druhého dne.

Důležitou roli při produkci vína hrají enzymy, které nemusí nutně pocházet z bobulí, ale mohou být produkovány některými kmeny kvasinek (Strauss et al., 2001). Proto byly izolované kmeny společně s kontrolním kmenem testovány na přítomnost β -glukosidázové aktivity. Na rozdíl od některých autorů (Delcroix et al., 1994; Comitini et al., 2011) nebyla u izolovaných kmenů detekována β -glukosidázová aktivita. Lze tedy říci, že produkce extracelulárních enzymů je opět kmenově závislá.

Suárez-Lepe a Morata (2012) uvádí, že kvasinky by taktéž měly být selektovány podle schopnosti degradovat kyselinu octovou a jablečnou. Výsledky testů ukázaly, že 91 % izolátů je schopno růst na agarovém médiu obsahujícím kyselinu jablečnou jako jediný zdroj uhlíku a 98 % izolátů je schopno růst na médiu obsahujícím kyselinu octovou. Na druhou stranu schopnost produkce kyseliny octové byla detekována u 29 % izolovaných kmenů. Výsledky jsou opět uvedeny v tab. 2 v příloze 3.

Jednou z negativních vlastností ovlivňujících nepříznivě organoleptický charakter vína je schopnost některých kmenů produkovat vysoké množství H_2S (Suárez-Lepe a Morata, 2012). Produkce H_2S byla testována na specifickém médiu obsahujícím bismut jakožto indikátor. 15 izolátů (29 %) produkovalo H_2S a zbylé kmeny produkovaly H_2S v malém množství. Jeden kmen (B) H_2S neprodukoval.

Byla testována i killerová aktivita¹ izolovaných kmenů. Zájem o kmeny kvasinek produkujících killerové toxiny vzrůstá, protože jak uvádí Zagorc et al. (2001), pokud jsou tyto kvasinky přítomny v prokvašeném moštu, mohou dominovat fermentaci. Jestliže killerové kmeny navíc vykazují ještě další pozitivní oenologické charakteristiky, produkováné víno může být výborné a fermentační proces je tzv. sám chráněný. Pro posouzení killerové aktivity byl zvolený křížový killerový test, tzn. že všechny identifikované izolované kmeny byly testovány na specifickém tuhém médiu proti vybraným izolovaným kmenům *S. cerevisiae* (1-09, L, I, A, A4, M, F) a proti komerčním kmenům (*S. cerevisiae* BS6 a VQ51). Izolované kmeny byly vybrány z hlediska vhodných oenologických vlastností (viz příloha 3). Kmen VQ51 by měl být podle protokolu dodávaného producentem killer-senzitivní, nepředpokládali jsme u něj tedy killerovu aktivitu. Nicméně proti některým kmenům (I, F) prokázal silnou killerovu aktivitu. Obdržená data (**tab. 22**) byla statisticky vyhodnocena v programu MiniTab. Výsledný dendrogram ukazuje procentuální podobnost jednotlivých testovaných kmenů ve smyslu produkce killerových toxinů (**obr. 22**). Mezi izoláty byly identifikovány pouze dvě početnější skupiny kmenů, které vykazovaly stejnou aktivitu vůči testovaným senzitivním kmenům. První

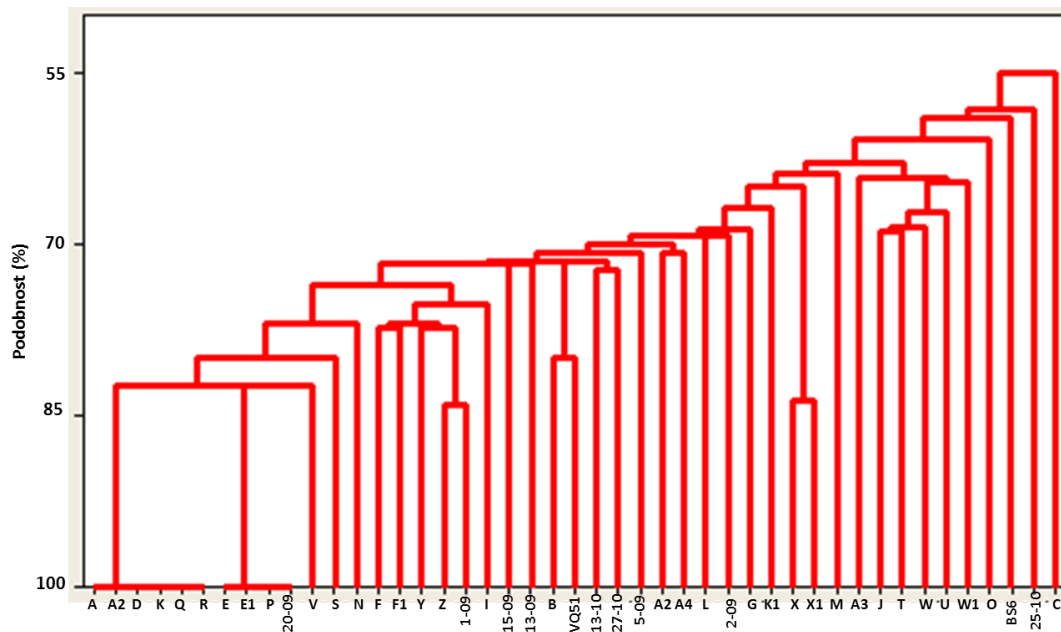
¹Killerová aktivita byla testována na YPD médiu (0,3% kvasniční extrakt, 1% pepton, 0,5% glukóza, 2% agar) obsahujícím 0,003% methylenovou modř. K 900 ml půdy bylo před sterilizací přidáno 100 ml citrát-fosfátového pufru (26,7 ml 0,1 M kyseliny citronové a 23,3 ml 0,2 M hydrogen fosforečnanu sodného a 50 ml vody). pH média bylo upraveno kyselinou citronovou na hodnotu 4,5. Po sterilizaci byla do zchlazeného média zamíchána kultura senzitivního kmene a po zatuhnutí byly na povrch agarové plotny očkovány čárkou vždy 4 testované kmeny. Přítomnost killerové aktivity byla detekována jako zóna kolem kolonie způsobená odbarvením média (Vadkertiová a Sláviková, 1995). methylenovou modř. K 900 ml půdy bylo před sterilizací přidáno 100 ml citrát-fosfátového pufru (26,7 ml 0,1 M kyseliny citronové a 23,3 ml 0,2 M hydrogen fosforečnanu sodného a 50 ml vody). pH média bylo upraveno kyselinou citronovou na hodnotu 4,5. Po sterilizaci byla do zchlazeného média zamíchána kultura senzitivního kmene a po zatuhnutí byly na povrch agarové plotny očkovány čárkou vždy 4 testované kmeny. Přítomnost killerové aktivity byla detekována jako zóna kolem kolonie způsobená odbarvením média (Vadkertiová a Sláviková, 1995).

skupina zahrnovala kmeny A, A2, D, K, Q a R, druhá pak kmeny E, E1, P, 20-09. Další izoláty byly odlišné z hlediska killerových aktivit proti potenciálním senzitivním kmenům a nevykazovaly v tomto parametru významnou statistickou podobnost (nejvyšší podobnost u dalších skupin byla 80 %). Killerova aktivita je vůči testovaným kmenům kmenově specifická vlastnost. Taktéž byly procentuálně zhodnoceny aktivity (silná, slabá a žádná) testovaných kmenů proti vybraným potenciálním senzitivním kmenům (**graf 2**). Zdá se, že vůči izolátům je nejsenzitivnějším kmenem kmen I, proti kterému vykazovalo slabou nebo silnou aktivitu 61 % testovaných izolátů. Naopak nejméně senzitivními kmeny se jeví být kmeny A4 a 1-09, vůči kterým vykazovalo aktivitu pouze 31 a 33 % testovaných kmenů. Z grafu je taktéž patrné, že killer-senzitivní odpovědi jsou u testovaných kmenů více rozšířené než produkce killerových toxinů. Větší rozšířenost kmenů senzitivních k toxinům v porovnání s kmeny vykazujícími killerovu aktivitu uvádí taktéž ve své publikaci Starmer et al. (1987) a Czárán a Hoekstra (2003).

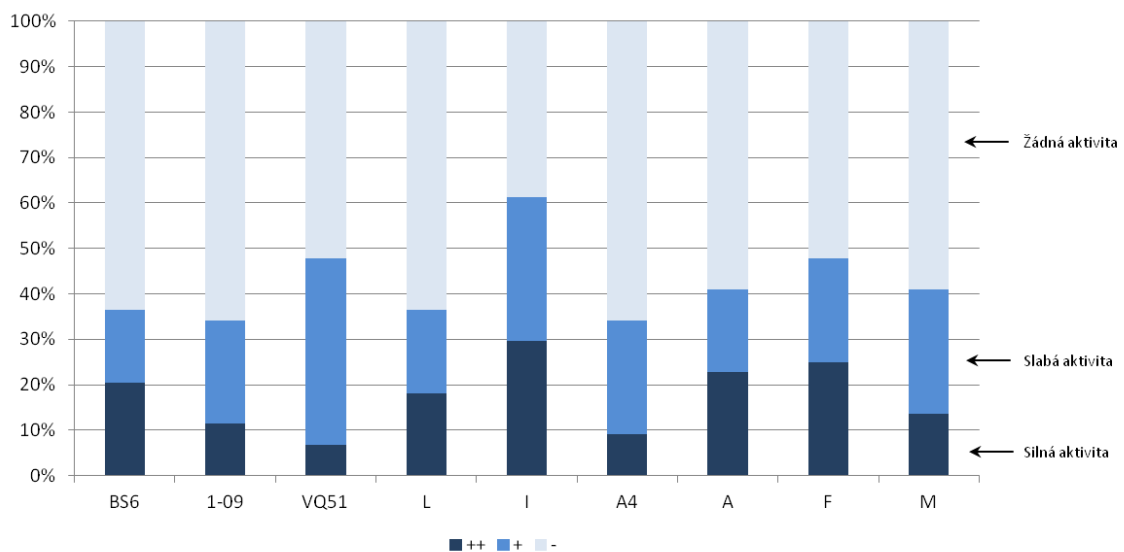
Podrobné testování killerových aktivit si vyžaduje další experimenty, např. identifikaci formy killerových toxinů (K1, K2, K28, KHR, KHS) pomocí izolace dsRNA (Gulbinene et al., 2004) apod., neboť aktivita je závislá na mnohých faktorech (např. pH, teplota). Je tedy otázkou, jak se dané kmeny projeví z hlediska produkce killerových toxinů při stresových podmínkách, které nastávají při jejich inokulaci do čerstvého moštu.

Tab. 22: Výsledky testování přítomnosti killerové aktivity. (-) killerová aktivita nedetekována; (+) slabá aktivita; (++) silná aktivita. Aktivita se projevila tvorbou zóny kolem kolonie (viz obr. 23).

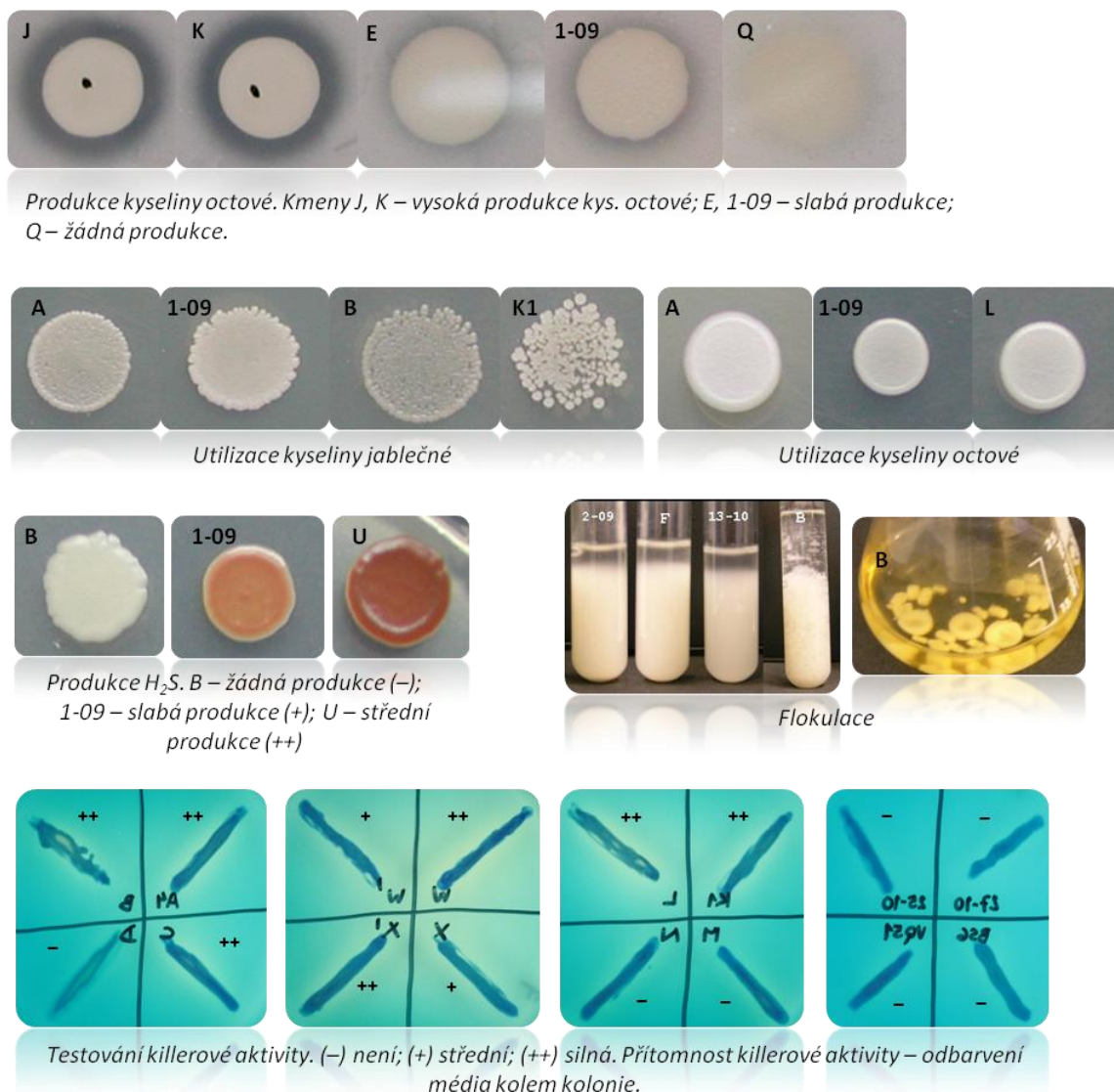
		POTENCIÁLNĚ SENZITIVNÍ KMEN <i>S. cerevisiae</i>								
		BS6	1-09	VQ51	L	I	A4	A	F	M
POTENCIÁLNÍ KILLEROVÝ KMEN <i>S. cerevisiae</i>	A	-	-	-	-	-	-	x	-	-
	A1	-	-	-	+	+	-	+	+	+
	A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A3	++	+	+	++	++	+	+	+	+
	A4	+	-	-	-	+	x	+	+	-
	B	-	-	-	-	++	-	-	++	-
	C	++	-	+	-	++	-	-	++	++
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	E1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	F	+	-	+	+	+	-	-	x	-
	F1	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	G	-	-	++	++	-	-	+	-	-
	I	-	+	+	+	x	-	-	+	-
	J	+	+	+	++	++	++	+	++	+
	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	K1	-	-	-	++	++	-	++	+	-
	L	-	+	+	x	+	-	+	++	+
	M	+	+	+	+	++	+	++	-	x
	N	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	O	-	++	+	-	-	++	++	+	++
	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	T	+	+	+	++	++	+	++	++	++
	U	++	++	++	++	++	+	++	++	++
	V	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	W	++	+	-	+	++	++	+	++	-
	W1	++	++	++	+	+	-	++	++	-
X	+	+	+	-	+	+	++	++	++	
X1	++	+	+	-	+	+	++	++	++	
Y	+	-	+	-	+	-	++	-	-	
Z	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
1-09	-	x	+	-	+	-	+	-	-	
2-09	-	-	-	-	-	-	++	-	-	
5-09	++	-	-	-	++	+	-	-	-	
13-09	++	-	+	-	-	-	-	-	-	
15-09	++	-	+	-	++	-	-	-	-	
20-09	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
13-10	-	+	-	-	+	-	-	+	+	
27-10	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
25-10	-	++	-	++	++	-	-	+	+	
BS6	x	++	+	++	+	++	-	+	-	
VQ51	-	-	x	-	++	+	-	++	-	



Obr. 22: Dendrogram statistického vyhodnocení podobnosti kmenů z hlediska produkce killerových toxinů proti vybraným potenciálně senzitivním kmenům. Data (viz **tab. 20**) byla vyhodnocena v programu MiniTab.



Graf 2: Procentuální znázornění killerových aktivit testovaných potenciálních killerových kmenů proti vybraným potenciálně senzitivním kmenům (viz osa X).



Obr. 23: Výsledky testování oenologických vlastností izolovaných a identifikovaných kmenů *S. cerevisiae*.

Selekce kmenů kvasinek nabízí lepší cestu získat kmeny *S. cerevisiae* (nebo i jiné vybrané kmeny) s vlastnostmi, které mohou zlepšit sensorický profil, technologické vlastnosti a pomoci zachovat regionální charakter vín (Suárez-Lepe a Morata, 2012). Testy provedené za účelem stanovení vlastností, které mohou ovlivnit fermentační proces a schopnost kvasinek adaptovat se na dané stresové podmínky, ukázaly odlišnosti mezi jednotlivými kmeny. U některých kmenů byla dokonce zaznamenána lepší adaptace na stresové podmínky než u kontrolního kmene *S. cerevisiae* BS6. Pokud tedy srovnáme všechny testované kmeny, pouze 15 ze 45 (A, A4, F, F1, I, J, L, M, R, S, X1, Z, 1-09, 2-09, 27-10) je vhodných k použití jakožto startovací kultura (viz příloha 3). Za účelem dalšího testování (v laboratorním a později i v provozním měřítku) byl vybrán autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09. Tento kmen byl izolován z bobulí Sauvignon, které byly pěstované ekologicky. Autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09 zároveň ukázal velmi podobné vlastnosti jako kontrolní kmen *S. cerevisiae* BS6. Kmen 1-09 byl posléze testován v malém objemu (50 litrů moštu z odrůdy Sauvignon a 50 litrů z odrůdy Rulandské modré) v roce 2011 již zmiňovaným vinařem, který posoudil vliv na výslednou sensorickou kvalitu vína ve srovnání s komerčním kmenem BS6. Kmen 1-09 byl vhodný z hlediska průběhu kvasného procesu i z pohledu výsledné sensorické kvality vína posouzené vinařem a tudíž

byl testován v roce 2012 ve velkoobjemových tancích ve srovnání s komerčním kmenem BS6. Výsledky fermentačního procesu jsou shrnuty v následující kapitole 4.2.4.

4.2.4 Testování autochtonního kmene ve vinařství – identifikace kvasinek v řízeném procesu fermentace, stanovení základních chemických parametrů a sensorické zhodnocení výsledných produktů

Snahou některých vinařů není jen dosáhnout určitého výsledného charakteru produktu, který by byl snadno odlišitelný od ostatních, tedy potlačit tzv. uniformitu vín získanou použitím komerčně dostupných kmenů, ale především zachovat autenticitu (regionální charakter). Proto ve spolupráci s již zmiňovaným moravským vinařstvím byl aplikován autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09. Selektovaná kultura byla kmenově identifikována (viz kapitola 4.2.2), testována z hlediska vyhovujících technologických vlastností (kapitola 4.2.3) a posléze laboratorně připravena k zakvácení moštu². Kulturou byl zaočkovaný mošt Sauvignon (ekologicky pěstovaná odrůda) a Rulandské modré (odrůda integrovaně a ekologicky ošetřená). Mošt odrůdy Sauvignon byl fermentován ve velkých nerezových tancích o objemu 500 litrů a mošt odrůdy Rulandské modré byl nakvášený v kádích o objemu taktéž 500 litrů. Jako srovnání pro závěrečné sensorické zhodnocení výsledných vín byl rovněž na stejné množství moštu k zakvácení použitý komerční kmen *S. cerevisiae* BS6. Celkově bylo tedy zakvášeno 6 moštů (3 kmenem BS6 a 3 izolovaným autochtonním kmenem *S. cerevisiae* 1-09). Technologii procesu si vedl sám vinař podle standardních postupů zavedených ve vinařství.

V průběhu celého kvasného procesu byl mošt sterilně odebírán v pravidelných intervalech a byly stanoveny základní chemické parametry moštu zahrnující koncentraci redukcujících sacharidů, koncentraci ethanolu, pH moštu, celkové titrovatelné kyseliny. Taktéž byl monitorován rozvoj nesaccharomycetní kvasinkové mikroflóry a stanoven celkový počet kvasinek (CFU·ml⁻¹) v daných fázích pokrývající celý kvasný proces. Navíc izolované kmeny *Saccharomyces* byly kmenově ověřeny (z důvodu možné křížové kontaminace komerčním/izolovaným kmenem). Na závěr bylo výsledné víno sensoricky zhodnoceno zkušenými degustátory. Z časových důvodů a z hlediska především mikrobiologického zaměření práce, nebyla u moštů provedena analýza vonných, těkavých a jiných látek pomocí analytických metod jako je např. GC, HPLC aj.

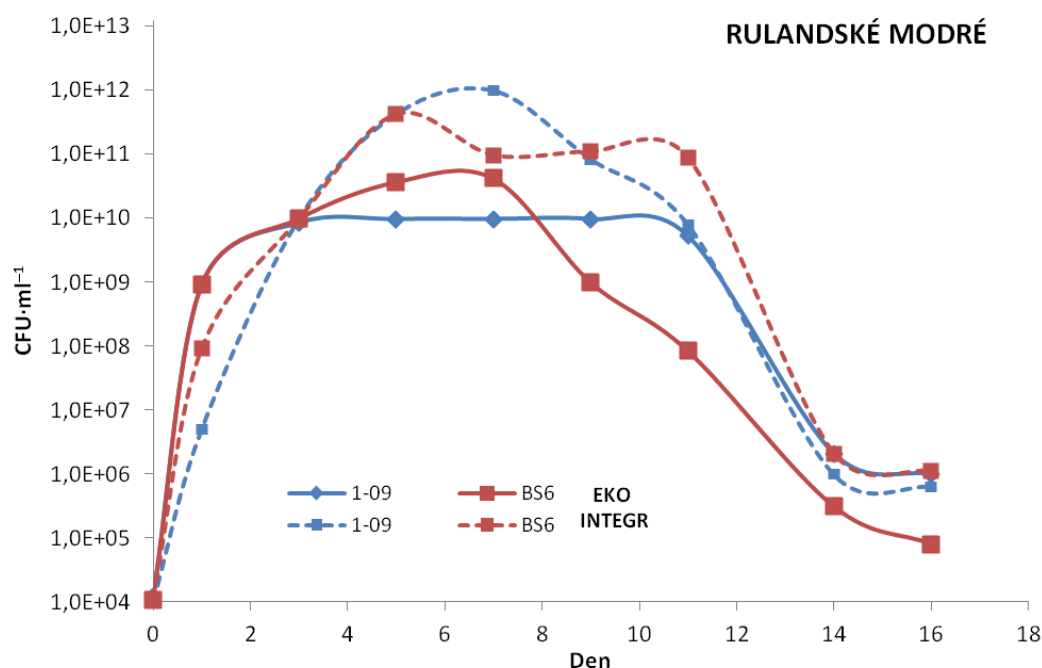
4.2.4.1 Monitoring kvasinkové mikroflóry v průběhu řízeného kvašení

Vzorky byly odebírány ze všech prokvácených moštů v pravidelných intervalech pokrývající celý kvasný proces, tzn., že u bílého vína byl odběr prováděn do 22. dne a u moštu odrůdy Rulandské modré do 16. dne procesu jeho fermentace. V rámci studie populace během fermentačního procesu byl stanoven celkový počet kvasinek (CFU·ml⁻¹), byly izolovány a identifikovány nesaccharomycetní druhy a kmenově identifikovány izolované druhy rodu *Saccharomyces*. Kvasinky byly izolovány a přečištěny na čisté kmeny stejným způsobem uvedeným v kapitole 4.1. Za účelem identifikace kvasinek byla aplikována metoda ITS-PCR-RFLP za použití 3 restričních endonukleáz *HaeIII*, *HinfI*

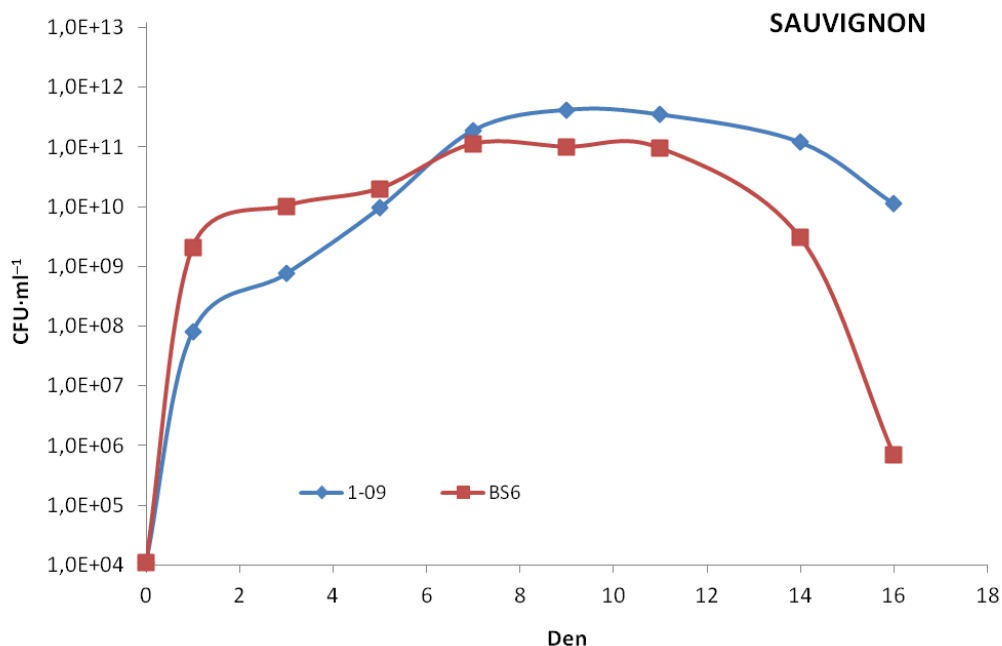
² **Propagace vinné kvasinky:** Nejprve byla připravena půda (0,1% kv. autolyzát, 2% glukóza nebo sacharóza). Do prázdných zkumavek byla vložena plynovka, přidáno médium tak, aby byla naplněná i plynovka a médium bylo cca 1 cm nad plynovkou. Do zkumavek byla zaočkována čistá kultura a zkumavky byly kultivovány 2–3 dny při 28 °C. Do Erlenmayerových baněk byla připravena stejná půda (vždy do poloviny objemu baňky), do které byl přelítý obsah zkumavek (1-2 zkumavky/baňka). Erlenmayerovy baňky byly ponechány na třepačce (cca 150 rpm) při laboratorní teplotě po dobu 2–3 dny. K zakvácení 10 litrů moštu bylo použito 100–250 ml připravené kultury (v případě potřeby může být kultura namnožena vinařem v daném moštu).

a *Hha*I. Restrikční fragmenty byly srovnány s databázemi uvedenými v kapitole 4.1. Neznámé izoláty (celkem 16) byly sekvenovány (SeqMe s.r.o). Sekvenována byla oblast ITS společně s D1/D2 LSU rDNA (1500 bp dlouhý amplicon).

Celkový počet kvasinek ($\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) je uveden v **grafu 3** a **grafu 4**. U červeného vína (**graf 3**) byla počáteční koncentrace kvasinek $4 \log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ (neinokulovaný mošt). Poté byla k moštu přidána příslušná startovací kultura. Z grafu je patrný rychlý nárůst kultury (jak komerční, tak i autochtonní) během prvních čtyř dnů fermentačního procesu. Maximální počet kvasinek se pohyboval v rozmezí od $10 \log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ do $12 \log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ a lišil se podle použité startovací kultury a typu ošetření odrůdy. Maximální koncentrace buněk byla detekována kolem 7. dne. Poté po devátém dnu docházelo k odumírání a sedimentaci buněk. Podle naměřených dat je patrné, že autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09 je schopný se rychle adaptovat na stresové podmínky (vysoká koncentrace sacharidů, limitace dusíkem apod.), kterým jsou buňky při inokulaci moštu vystaveny při velkoobjemové fermentaci. Taktéž byl nárůst kultury *S. cerevisiae* 1-09 velmi rychlý, což ukazuje na hladký průběh fermentace (nedošlo k vleklé fermentaci vyvolané např. limitací dusíku apod.). Průběh kvasného procesu z hlediska nárůstu biomasy autochtonní kultury *S. cerevisiae* 1-09 je srovnatelný s nárůstem biomasy komerční kultury *S. cerevisiae* BS6. Celkový počet kvasinek byl sledován i v průběhu kvašení bílého vína Sauvignon (**graf 4**). Nárůst biomasy obou použitých kultur byl velmi rychlý. Maximální koncentrace buněk byla pozorována kolem sedmého dne a pohybovala se mezi $11 - 12 \log \text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$. Průběh byl srovnatelný u obou použitých startovacích kultur.



Graf 3: Celkový počet kvasinek ($\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) detekovaný v průběhu kvasného procesu řízené produkce červeného vína Rulandské modré (integrováná a ekologická produkce). Použita byla **komerční (BS6)** a **autochtonní (1-09)** startovací kultura. Stanovení bylo provedeno 3×; standardní směrodatné odchytky nebyly vyšší než 10 %.



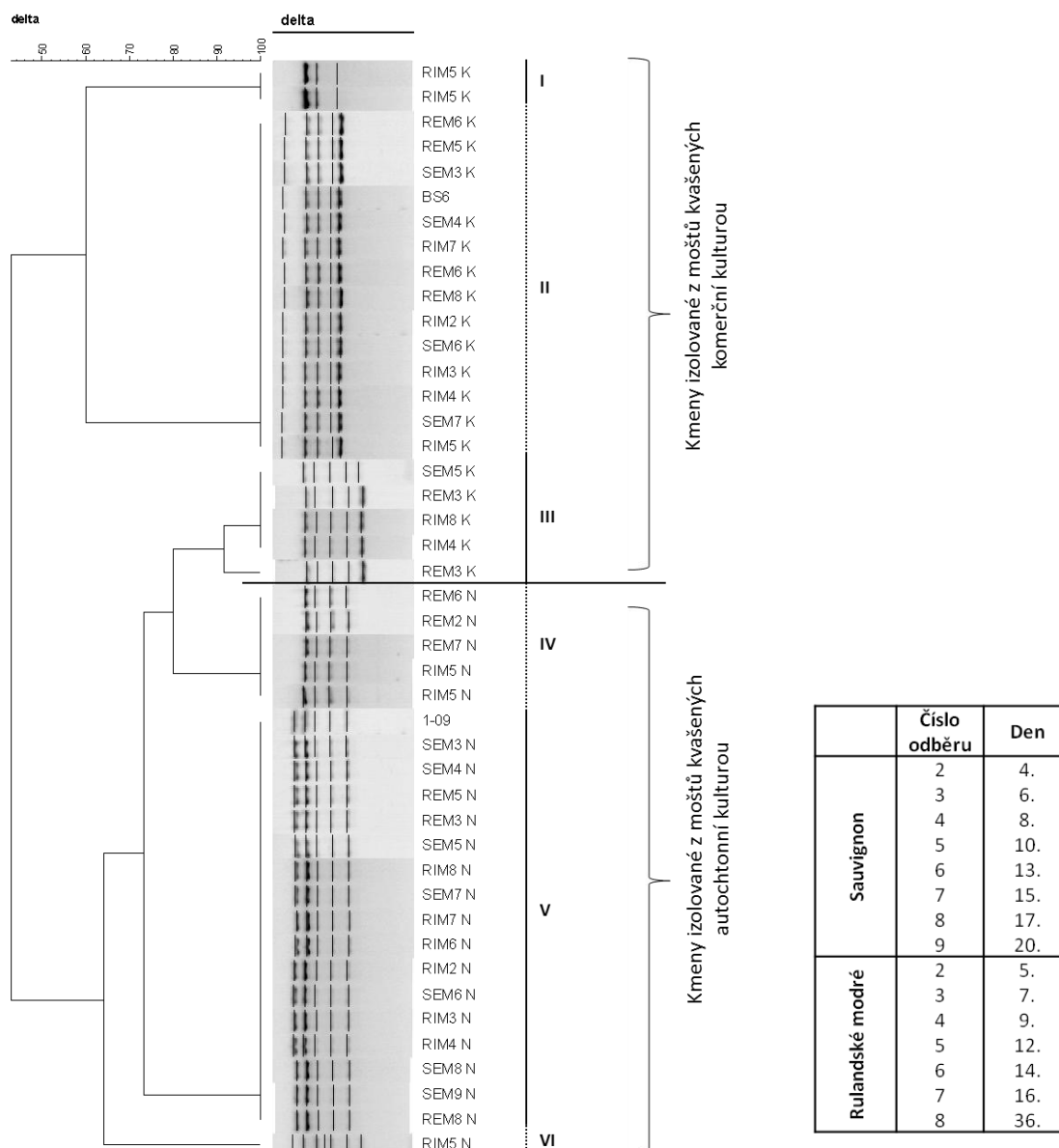
Graf 4: Celkový počet kvasinek ($\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) detekovaný v průběhu kvasného procesu řízené produkce bílého vína Sauvignon (ekologická produkce). Použita byla **komerční (BS6)** a **autochtonní (1-09)** startovací kultura. Stanovení bylo provedeno 3×; standardní směrodatné odchylky nebyly vyšší než 10 %.

Kromě kmenů *S. cerevisiae* byly z moštů ještě navíc izolovány následující druhy: *I. occidentalis*, *I. orientalis*, *C. valida*, *C. vini*, *Z. bailii* a běžně se vyskytující druh *H. uvarum*. Z moštů byl izolován taktéž druh *I. scutulata* var *exigua*, dále pak *P. membranifaciens* a *P. kluyveri*. Některé izoláty byly zařazeny i po sekvenaci (nízká podobnost) pouze rodově – *Pichia* sp. Jak již bylo popsáno v kapitole 4.1.2.2, druhy rodu *Pichia* jsou si zřejmě natolik podobné a tudíž jejich druhová identifikace je složitá. Přítomnost těchto druhů v jednotlivých odběrech fermentovaných moštů je uvedena souhrnně v **tab. 23**.

Všechny izolované kmeny identifikované metodou ITS-PCR-RFLP jako rod *Saccharomyces* byly identifikovány kmenově specifickými primery pro druh *S. cerevisiae* (viz kapitola 4.2.1.3) a všechny druhy *S. cerevisiae* byly podrobeny typizaci delta úseků za účelem kmenové identifikace tohoto druhu (kontroly růstu kmene během procesu) a posouzení vedení procesu fermentace bez křížové kontaminace komerční kulturou *S. cerevisiae* BS6 nebo naopak námi izolovaným kmenem *S. cerevisiae* 1-09. Výsledky jsou ukázány v rámci dendrogramu na **obr. 24**. Izolované kmeny *S. cerevisiae* byly rozděleny do dvou větších skupin, kdy první skupina je tvořena kmeny izolovanými z moštů zakvašených komerční kulturou a druhá skupina kmeny autochtonní kultury. Lze tedy říci, že daný proces probíhal bez křížové kontaminace. Navíc je z daného dendrogramu patrné, že v příslušných moštech se nevyskytoval pouze kmen *S. cerevisiae*, který byl použit k zaočkování moštů, ale i kmeny jiné. Např. u moštů kvašených přidavkem komerční kultury *S. cerevisiae* BS6 byly identifikovány tři skupiny odlišných kmenů. Jedna skupina (viz označení II) náležela komerčnímu kmenu. Dvě skupiny (IV, VI) tvořící odlišné kmeny, byly taktéž identifikovány i u moštů zakvašených autochtonním kmenem. Jeden kmen náležel do skupiny VI a byl izolován z moštu odrůdy Rulandské modré ošetřované integrovaně.

Tab. 23: Identifikované kmeny (metodou ITS-PCR-RFLP) izolované v průběhu řízeného kvasného procesu za přídavku kultury kvasinek. B značí mošt odebraný ihned po vylisování – tedy bez přídavku startovací kultury.

KOMERČNÍ KULTURA <i>S. cerevisiae</i> BS6		
RULANDSKÉ MODRÉ		
Den	Integrovaná	Ekologická
B	<i>Z. bailii</i> , <i>H. uvarum</i>	<i>C. valida</i> , <i>C. vini</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Pichia</i> sp.
1	<i>H. uvarum</i> , <i>I. occidentalis</i> , <i>C. valida</i>	<i>H. uvarum</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>C. valida</i>
3	<i>H. uvarum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>	<i>H. uvarum</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>C. valida</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>S. cerevisiae</i>
5	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
7	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. valida</i> , <i>S. cerevisiae</i>
9	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
12	<i>Z. bailii</i> , <i>C. valida</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Pichia</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>
14	<i>Z. bailii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia</i> sp.	<i>C. vini</i> , <i>C. valida</i> , <i>S. cerevisiae</i>
16	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
AUTOCHTHONNÍ KULTURA <i>S. cerevisiae</i> 1-09		
RULANDSKÉ MODRÉ		
Den	Integrovaná	Ekologická
B	<i>I. orientalis</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>I. scutulata</i> var <i>exigua</i>	<i>H. uvarum</i> , <i>I. scutulata</i> var <i>exigua</i>
1	<i>H. uvarum</i> , <i>I. scutulata</i> var <i>exigua</i>	<i>H. uvarum</i> , <i>I. scutulata</i> var <i>exigua</i>
3	<i>H. uvarum</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>I. orientalis</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>S. cerevisiae</i>
5	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
7	<i>Z. bailii</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>C. valida</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>S. cerevisiae</i>
9	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. kluyveri</i>	<i>S. cerevisiae</i>
12	<i>C. valida</i> , <i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
14	<i>C. valida</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i>
16	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
AUTOCHTHONNÍ KULTURA <i>S. cerevisiae</i> 1-09 + KOMERČNÍ KULTURA <i>S. cerevisiae</i> BS6		
SAUVIGNON – Eko		
Den	<i>S. cerevisiae</i> 1-09	<i>S. cerevisiae</i> BS6
B	<i>H. uvarum</i> , <i>I. orientalis</i>	<i>H. uvarum</i> , <i>Pichia</i> sp.
0	<i>H. uvarum</i> , <i>I. orientalis</i>	<i>H. uvarum</i> , <i>P. membranifaciens</i>
2	<i>H. uvarum</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>S. cerevisiae</i>	<i>H. uvarum</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Pichia</i> sp.
4	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>
6	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i>	<i>C. vini</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>
8	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Z. bailii</i> , <i>P. membranifaciens</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>
10	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Pichia</i> sp.	<i>S. cerevisiae</i> , <i>I. scutulata</i> var <i>exigua</i> , <i>P. membranifaciens</i>
13	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>	<i>Z. bailii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>
15	<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia</i> sp.
17	<i>S. cerevisiae</i> , <i>C. vini</i> , <i>Z. bailii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
20	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>



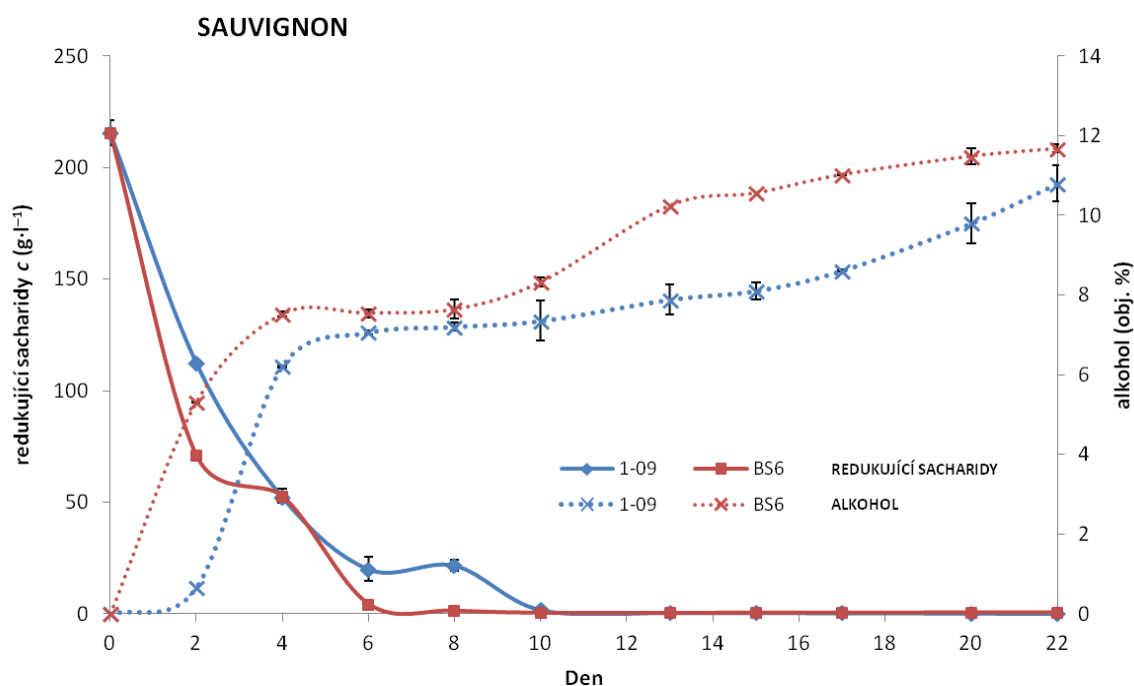
Obr. 24: Vyhodnocení kmenů *S. cerevisiae* izolovaných v průběhu kvašení. Kontrola kvasného procesu z hlediska rozvoje startovacího kmene *S. cerevisiae* a možné křížové kontaminace mezi moštů kvašenými komerčním kmenem BS6 a autochtonním kmenem 1-09. Izolovaná rDNA kvasinek byla amplifikována primery $\delta 1$ - $\delta 2$. Popis zkratk: R – Rulandské modré; S – sauvignon; E – eko; I – integr.; M – mošt; K – komerční kultura; N – autochtonní kultura; čísla značí jednotlivé odběry. Tzn. např. RIM5 K značí kmen izolovaný z moštu odrůdy Rulandské modré, 5. odběr a mošt byl zakvašen komerční kulturou. 5. odběr pak představuje 12. den fermentačního procesu. Jednotlivé dny jsou pro lepší přehled uvedeny v tabulce vpravo.

4.2.4.2 Stanovení základních chemických parametrů – posouzení průběhu fermentačního procesu

Odebírané vzorky moštů byly sledovány i z hlediska základních chemických parametrů. Podle *O.I.V. Compendium of International methods of wine and must analysis* byly stanoveny následující charakteristiky: koncentrace redukujících sacharidů a alkoholu, pH moštů, celkové titrovatelné

kyselin³. Základní chemické parametry byly sledovány z důvodu kontroly průběhu kvasného procesu a posouzení vhodnosti použití autochtonní kultury při velkoobjemové fermentaci. Stanovením základních chemických parametrů, jako je spotřeba sacharidů a nárůst koncentrace etanolu lze posoudit vedení kvasného procesu a schopnost daných startovacích kultur rychlé adaptace na počáteční stresové podmínky.

Při výrobě bílého vína byl pokles koncentrace sacharidů doprovázen nárůstem koncentrace ethanolu, přičemž tento jev byl pomalejší než u červeného vína. Ve všech případech byla koncentrace alkoholu vyšší u vína připraveného za použití komerční startovací kultury BS6, nicméně rozdíl se pohybovaly v rozmezí do 2 obj. % alkoholu (**graf 5** a **graf 6**). Z **grafů 5** a **6** je taktéž patrné, že průběh fermentačního procesu při aplikaci autochtonního kmene je velmi podobný jako v případě použité komerční startovací kultury.

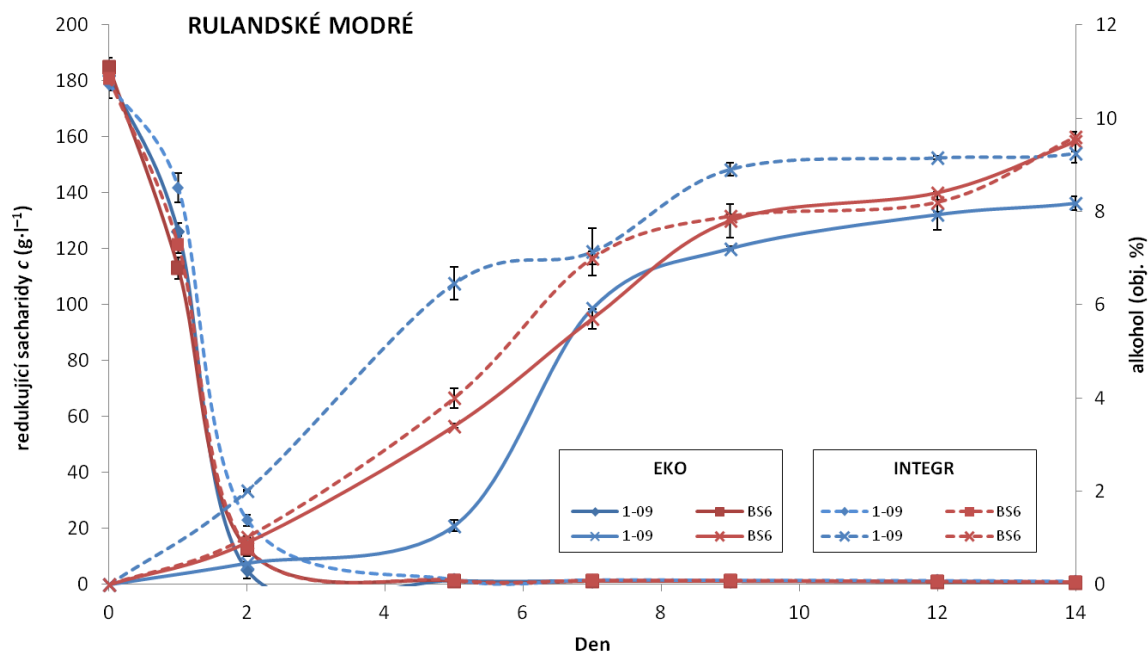


Graf 5: Změny v koncentraci redukujících sacharidů a etanolu v průběhu řízeného kvasného procesu výroby bílého vína Sauvignon (ekologická produkce). Mošt byl zakvášen komerční (BS6) a autochtonní (1-09) kulturou.

³ **Stanovení koncentrace redukujících sacharidů:** Nejprve byly připraveny roztoky I (24 g bezvodého Na₂CO₃, 16 g NaHCO₃, 144 g bezv. Na₂SO₄; 12 g vinanu sodno-draselného a 800 ml vody), II (4 g CuSO₄·5H₂O, 24 g bezv. Na₂SO₄, 200 ml vody), III (25 g molybdenanu amonného rozpuštěného v 450 ml vody, 21 ml H₂SO₄, 3 g Na₂HAsO₄·7H₂O rozp. ve 25 ml vody). Roztok III byl ponechán 48 hodin při laboratorní teplotě ve tmě. Redukující sacharidy ve vzorku byly stanoveny následovně: k 1 ml vzorku moštu bylo přidáno 0,5 ml roztoku I a 0,5 ml roztoku II. Po desetiminutovém provaření a zchlazení vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku III. Vše bylo důkladně promícháno a doplněno vodou na objem 10 ml. Spektrofotometricky byla měřena absorbance při vlnové délce 720 nm. Kalibrace vycházela z glukózy.

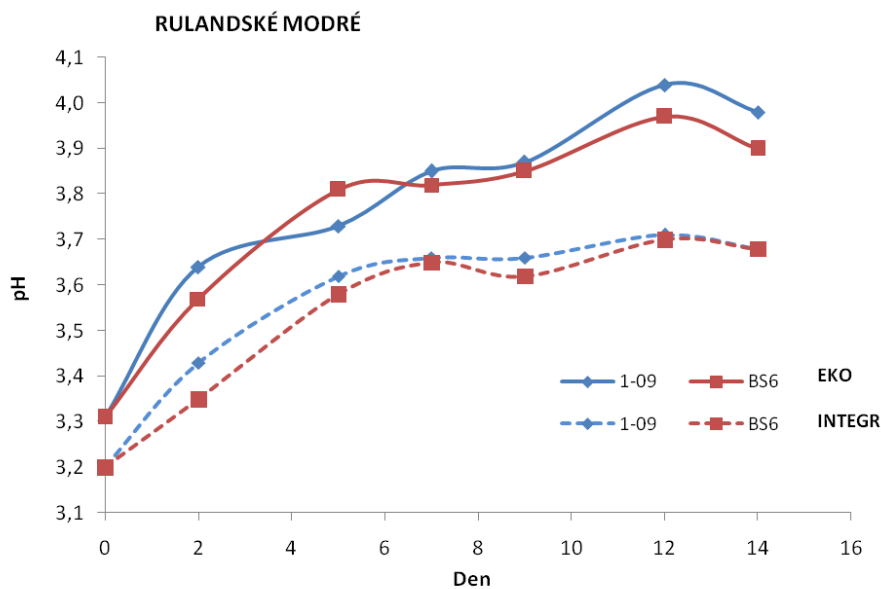
Stanovení koncentrace alkoholu: Koncentrace alkoholu byla stanovena pyknometricky – destilací. Čistý pyknometr byl zvážen, poté doplněn vodou po značku a zvážen. Do destilační baňky bylo dáno 20 ml moštu, mošt byl zneutralizován 0,1 M roztokem hydroxidu sodného na fenolftalein, bylo přidáno 20 ml vody a kousky pemzy. Po oddestilování ¾ objemu byl pyknometr doplněn vodou a zvážen. Poté byl stanoven % obsah alkoholu v daném vzorku.

Stanovení celkových titrovatelných kyselin: Roztok moštu byl zahřátý na 80 °C, zchlazen a poté potenciometricky titrován odměrným roztokem KOH do pH 7. Ze spotřeby byla vypočítána koncentrace celkových titrovatelných kyselin, která byla vřazena na kyselinu vinnou.

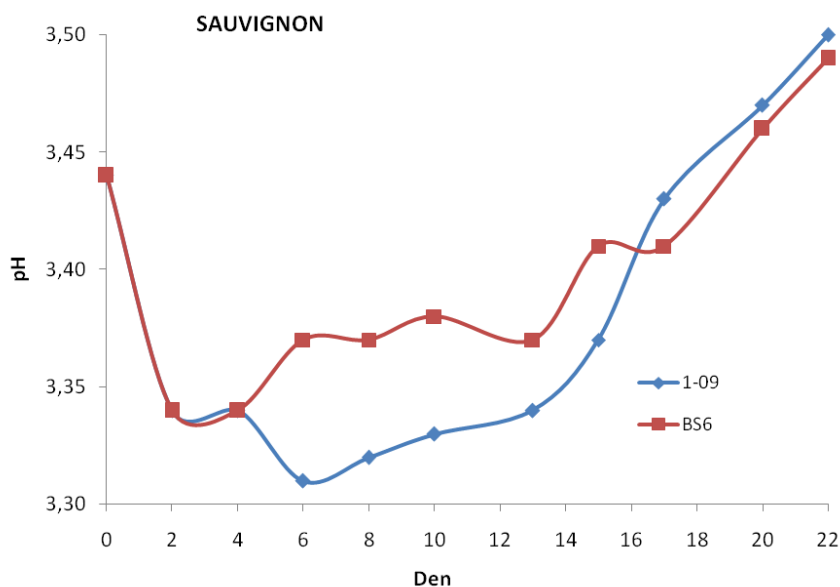


Graf 6: Změny v koncentraci redukujících sacharidů a etanolu v průběhu řízeného kvasného procesu výroby červeného vína Rulandské modré. Mošt byl zakvášen komerční (BS6) a autochtonní (1-09) kulturou.

Z hlediska změn pH (viz **graf 7, 8**) během fermentačního procesu nebyl u odrůdy Rulandské modré pozorován výrazný rozdíl při inokulaci moštu komerční (BS6) a autochtonní (1-09) startovací kulturou. Naopak u moštu připraveného z odrůdy Sauvignon byl v šestém dnu zaznamenán mírný pokles pH u moštu inokulovaného autochtonní kulturou oproti komerční kultuře, kdy došlo k mírnému nárůstu pH.

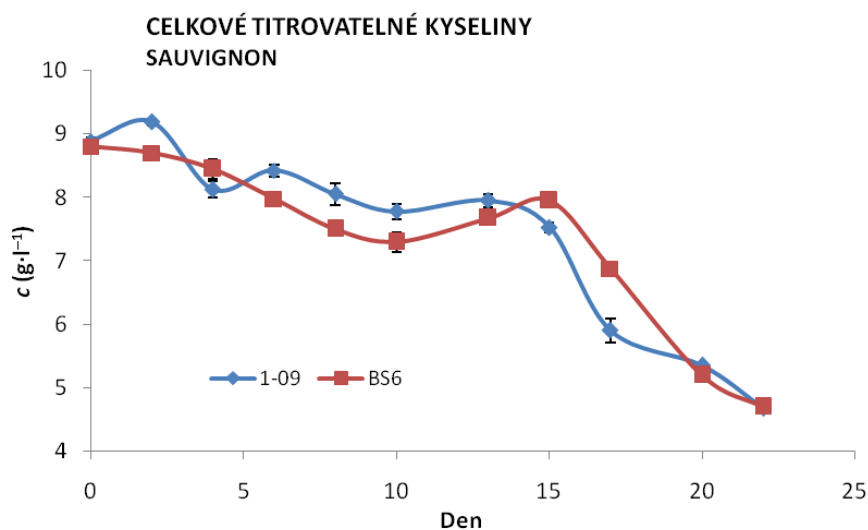


Graf 7: Závislost pH odebíraných moštů odrůdy Rulandské modré pěstované na integrované a ekologicky ošetřované vinici a zakvášené rozdílnými kulturami kvasinek na čase. 1-09 značí izolovaný kmen; BS6 komerčně dostupnou kulturu.

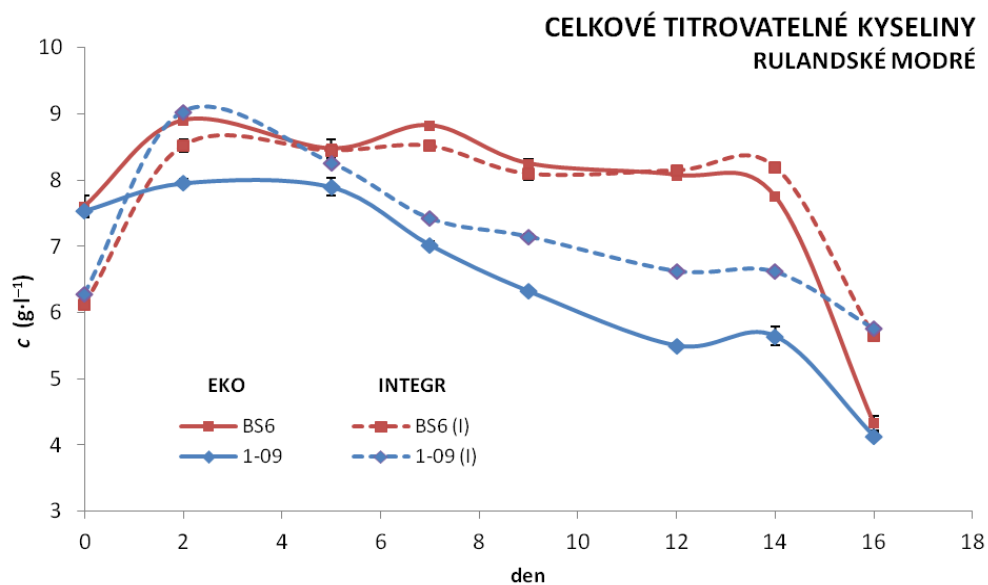


Graf 8: Srovnání pH odebíraných moštů odrůdy Sauvignon pěstované na ekologicky ošetřované vinici a zakvašené rozdílnými kulturami kvasinek: 1-09 značí izolovaný kmen; BS6 komerčně dostupnou kulturu.

Co se týče celkových titrovatelných kyselin vztažených na kyselinu vinnou, tak u bílého vína (Sauvignon) byla závislost tohoto parametru podobná bez ohledu na použité startovací kultuře (viz **graf 9**). Na druhou stranu u odrůdy Rulandské modré i přes to, že výsledná kyselost moštu byla na konci fermentace velmi podobná, byl průběh koncentrace kyselin při použití obou kvasinek odlišný (**graf 10**). Zatímco u kmene *S. cerevisiae* 1-09 byl pokles celkových titrovatelných kyselin postupný, u kmene *S. cerevisiae* BS6 došlo ke skokovému poklesu titrovatelných kyselin až v posledních dnech fermentace.



Graf 9: Změny celkových kyselin vztažených na kyselinu vinnou v závislosti na čase fermentace.



Graf 10: Změny celkových kyselin vztahovaných na kyselinu vinnou v závislosti na čase v průběhu fermentace.

Podle základních parametrů používaných k rychlému zhodnocení průběhu fermentačního procesu je možné konstatovat, že oba použité kmeny jsou si fyziologicky podobné. To je taktéž v souladu s testovanými oenologickými vlastnostmi popsanými v rámci kapitoly 4.2.3, kdy autochtonní kultura byla vlastnostmi podobná komerční kultuře. Autochtonní kulturu je tedy možné použít jako startovací kulturu při velkoobjemové fermentaci.

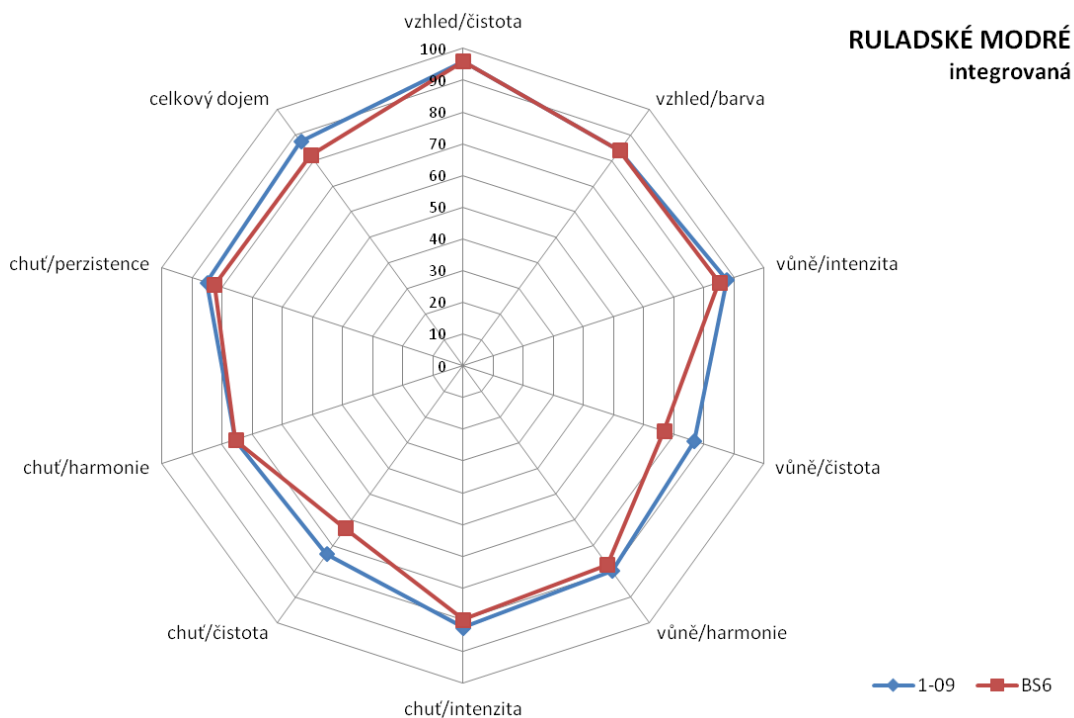
4.2.4.3 Senzorické zhodnocení finálních produktů

Na závěr byly jednotlivé finální produkty zhodnoceny sensoricky. Sensorického hodnocení se z důvodu obtížnosti rozeznat rozdíly a posoudit celkový charakter vína z hlediska aplikace komerční a izolované autochtonní kultury účastnili odborníci a vyškolení degustátoři (celkem 5 osob, **obr. 25**). Závěrečné zhodnocení vyprodukovaných vín probíhalo ve specializované laboratoři určené pro sensorické hodnocení potravin při FCH VUT v Brně. Sensoricky byla hodnocena všechna vína, tedy Rulandské modré (integr + eko) a Sauvignon (eko) obojí zakvášené jak komerční, tak autochtonní kulturou. Byla použita 100 bodová stupnice, která se běžně využívá při soutěžním hodnocení vín. Výsledky sensorického hodnocení byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny v **grafech 11 a 12**.

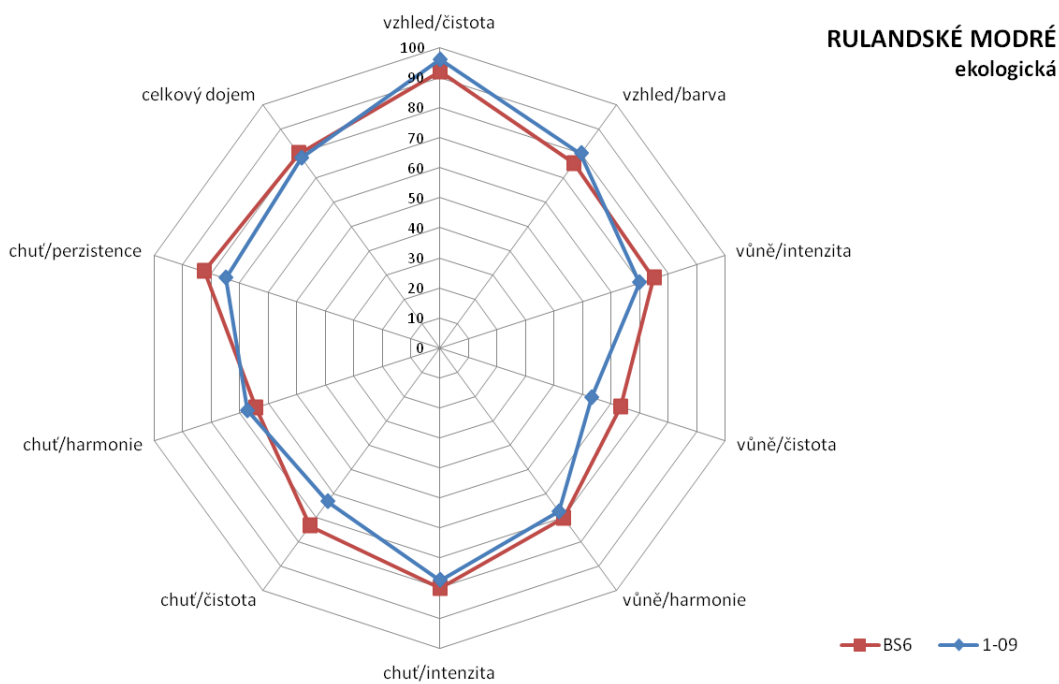
Na základě výsledků sensorického hodnocení se testovaná vína v některých posuzovaných parametrech nelišila a v některých se lišila jen mírně (**graf 11 a 12**). Hodnotitelé posuzovali vína velmi kladně. Na základě osobitého a originálního charakteru výsledného produktu by výsledkem mohlo být podání žádosti certifikátu VOC (víno originální certifikace) vinařem.



Obr. 25: Ukázka sensorického hodnocení výsledných produktů profesionálními hodnotiteli vín.



Graf 11: Souhrnné výsledky senzoričkého zhodnocení finálních produktů červeného vína odrůdy Rulandské modré integrované produkce. Jednotlivé parametry byly senzoričsky hodnoceny pěti osobami. Směrodatné odchylky nebyly větší než 10 %.



Graf 12: Souhrnné výsledky senzoričkého zhodnocení finálních produktů červeného vína odrůdy Rulandské modré ekologické produkce. Jednotlivé parametry byly senzoričsky hodnoceny pěti osobami. Směrodatné odchylky nebyly větší než 10 %.

4.3 Identifikace kvasinek izolovaných z ručně vyráběných sýrů

Problematika této části disertační práce byla řešena na Biotechnické Fakultě na Univerzitě v Lublani ve Slovinsku v rámci čtyř a půl měsíčního studijního pobytu. Cíle práce vycházely z evropského projektu **SEE-ERA-NET Plus Project ERA-195/01 (PSALAB)** s názvem „*Conservation and standardisation of traditional technologies of fermented milk products based on autochthonous microbiota*“. Záměrem části projektu byla identifikace a charakterizace přirozeně se vyskytující kvasinkové mikroflóry izolované z tradičních sýrů vyráběných v zemích západního Balkánu (WBC). Navíc byla zavedena semi-kvantitativní metoda přímé detekce kvasinek a plísní v potravinách.

WBC je evropský region s dlouholetou zkušeností s produkcí tradičních mléčných produktů vyráběných spontánní fermentací z kravských, ovčích a kozích mlék. Různé spontánně fermentované mléčné produkty, jako jsou bílé sýry zrající v solném nálevu a čerstvé měkké sýry aj., jsou vyráběny v domácnostech z nepasterizovaného mléka bez použití komerční startovací kultury. Samotné startovací kultury tedy tvoří mikroorganismy přirozeně se vyskytující v čerstvém mléce. Mikroorganismy, zahrnující jak BMK, plísně, tak i kvasinky, přispívají k údržnosti, k tvorbě aroma a textury, což ve výsledku dodává sýru unikátní charakteristiky. Senzorické vlastnosti těchto sýrů tedy závisí na jeho přirozeném mikrobiálním složení (Irlinger a Mounier, 2009; Golíc et al., 2013).

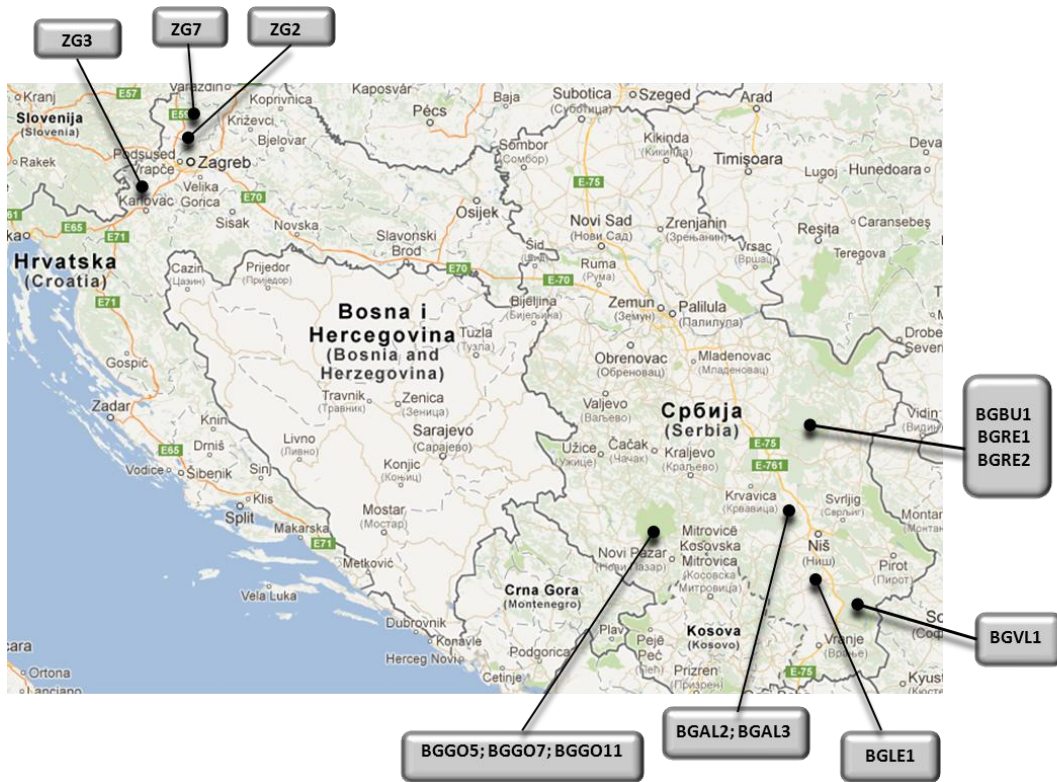
Ručně vyráběné sýry byly odebrány ve třech oblastech v Srbsku (Južná Morava, Golija a východní horská oblast) pracovně značených BG a ve třech oblastech v Chorvatsku (Zagorje, Prigorje a Bilogorsko-Podravská oblast) označené jako ZG. Lokality odběru vzorků jsou znázorněny na **obr. 26** a **27** a popsány i s charakteristikou sýrů souhrnně v **tab. 24** a **25**.

Na základě povědomí spotřebitelů o tradičně ručně vyráběných sýrech roste v Evropě trh s těmito fermentovanými produkty. Nicméně dvě tendence, které mohou vést jak k potenciální ztrátě diverzity produktů, tak i mikroflóry, mohou interferovat s tradicí. Spotřebitelé mají striktní požadavky na čerstvost, zdraví a bezpečnost potravin. To všechno spojené s přísnější evropskou legislativou bezpečnosti potravin (HACCP) má za následek snížení flexibility produkce a potlačení až zánik regionálních ručně vyráběných fermentovaných produktů. Taktéž existence malých a středních podniků vede k agresivní strategii v konkurenci s velkými firmami, čímž dochází ke ztrátě tradičního „know-how“, což ve výsledku vede ke ztrátě kvality a diverzity. Očekává se, že přinejmenším 30 % tradičních výrobků spadajících pod kulturní bohatství se vytratí, což s sebou ponese i ztrátu mikroorganismů s potenciálními inovačními technologickými vlastnostmi.

Výše popsané bylo motivací izolace, identifikace a uchování původní kvasinkové mikroflóry izolované z tradičně vyráběných sýrů. Tato kapitola je rozdělena na dvě části: (1) Genotypová a fenotypová identifikace přirozených kvasinek v sýrech a (2) Zavedení přímé semi-kvantitativní identifikační metody. Obě části byly nebo budou publikovány formou článků v impaktovaných časopisech a jsou tedy uvedeny v příloze 4 a 5. V rámci kapitol budou komentovány s odkazem na danou přílohu.



Obr. 26: Srbsko (Glavičak), jedna z lokalit odběru vzorků; část procesu výroby sýru a výsledný sýr.



Obr. 27: Znáznornění míst odběru sýrů v Srbsku a Chorvatsku. Jednotlivé zkratky jsou popsány v tabulce níže.

Tab. 24: Popis lokalit a charakteristika sýrů použitých v 4.3.1.

Označení vzorku	Lokalita	Nadmořská výška m/m	Druh sýru Stáří	Použité mléko
BGGO5	Golija, Ivanjica Srbsko	1000	bílý polotvrdý 10 dní	kravské považené, odstředěné
BGGO7		1000	bílý polotvrdý 60 dní	kravské považené, odstředěné
BGGO11		900	bílý polotvrdý 10 dní	kravské považené, odstředěné
BGLE1	Južná Morava, Leskovac Srbsko	260	bílý měkký 2 dny	kravské nepasterizované
BGAL2	Južná Morava, Aleksinac Srbsko	310	bílý měkký 1 den	kravské nepasterizované
BGAL3		310	bílý měkký 10 dní	kravské nepasterizované
BGVL1	Južná Morava, Vlasina Srbsko	1307	bílý polotvrdý 33 dní	kravské nepasterizované
BGBU1	Beljanica Srbsko	800	bílý polotvrdý 3 dny	ovčí nepasterizované
BGRE2	Glavičak Srbsko	1005	bílý měkký 10 dní	kravské + ovčí nepasterizované
ZG2	Prigorje, Sveti Ivan Zelina Chorvatsko	90	bílý měkký 1 den	kravské nepasterizované
ZG3	Prigorje, Karlovac Chorvatsko	112	bílý měkký 1 den	kravské nepasterizované
ZG7	Zagorje, Novi Marof Chorvatsko	150	bílý měkký 1 den	kravské nepasterizované

Tab. 25: Charakteristika sýrů a jejich vedlejších produktů použitých v 4.3.2. Oblast L1 je na mapě (obr. 27) znázorněna jako BGRE2; oblast L2 jako BGBU1.

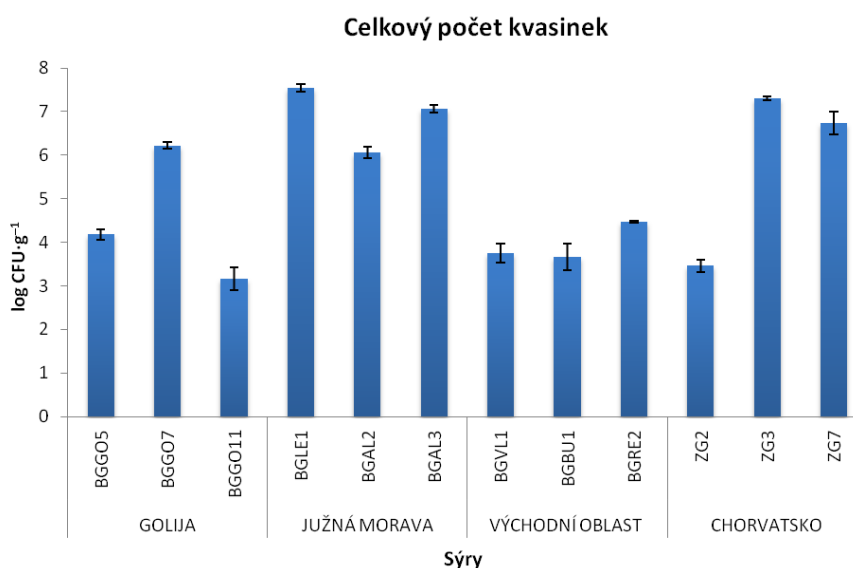
Označení vzorku	Lokalita	Nadmořská výška m/m	Druh sýru Stáří	Použité mléko
Sýr (C1L1) Syravátka (WL1) Solný nálev (BL1)	L1 Glavičak, hory Beljanica Nejbližší město Despotovac Východní oblast Srbska	1005	bílý sýr zrající v solném nálevu 1 den	ovčí nepasterizované
Sýr (C10L1)	L1 Glavičak, hory Beljanica Nejbližší město Despotovac Východní oblast Srbska	1005	bílý měkký sýr 10 dnů	ovčí nepasterizované
Sýr (C3L2) Syravátka (WL2) Solný nálev (BL2)	L2 Bučina, hory Beljanica Nejbližší město Despotovac Východní oblast Srbska	800	bílý polotvrdý 3 dny	kravské (20 %) ovčí (80 %) nepasterizované

4.3.1 Genotypová a fenotypová identifikace přirozeně se vyskytujících kvasinek v sýrech

Výsledky této části práce byly publikovány v odborném časopise a jsou uvedeny v příloze 4 Golić et al., *International Journal of Food Microbiology*, 2013. Publikace je zaměřena na identifikaci komplexní mikroflóry sýrů; část týkající se BMK byla vypracována na jiných pracovištích pracovníky zapojenými do projektu a není tedy součástí disertační práce. Naopak její součástí je část věnující se analýze kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů.

Obecně není přítomnost kvasinek v sýrech jen výsledkem znehodnocení produktů, ale především díky jejich proteolytické a lipolytické aktivitě přispívají ke zrání sýrů (Irlinger a Mounier, 2009). Taktéž mohou podporovat funkci startovacích kultur a jiných prospěšných mikroorganismů. Díky snadné adaptaci některých druhů k substrátu bohatému na proteiny, sacharidy a organické kyseliny bývají často detekovány v mléčných produktech. Současně některé druhy jsou schopny růst při vysoké koncentraci solí, nízké teplotě, pH a vodní aktivitě (Lopandic et al., 2006). Přítomnost kvasinek v sýrech je žádoucí z hlediska jejich příspěvku ke zrání sýrů a produkci organoleptických látek (Viljoen et al., 2003). Na druhou stranu však může vést i ke znehodnocení produktů (Corbo et al., 2001).

V této části práce byly kvasinky izolovány celkem z osmnácti sýrů pocházejících z Chorvatska a ze Srbska. V šesti chorvatských sýrech nebyly kvasinky detekovány. Z dvanácti sýrů, jejichž charakteristiky jsou popsány v **tab. 24** bylo izolováno celkem 433 izolátů, které byly jedenkrát přečištěny a dále podrobeny identifikaci. Celkový počet kvasinek v jednotlivých vzorcích uvedený v **grafu 13** se pohyboval v rozmezí 3,1 – 7,5 log CFU·g⁻¹ v závislosti na lokalitě a stádiu zrání. Obecně jsou kvasinky dominantní během prvotních stádií zrání následované bakteriální dominancí. Počty kvasinek v sýrech mohou být ovlivněny mnoha faktory, jako jsou druh mléka a jeho ošetření, krmení zvířat, lokalita, postup výroby sýru apod. (Corsetti et al., 2001).



Graf 13: Celkový počet kvasinek (log CFU·g⁻¹) izolovaných ze sýrů.

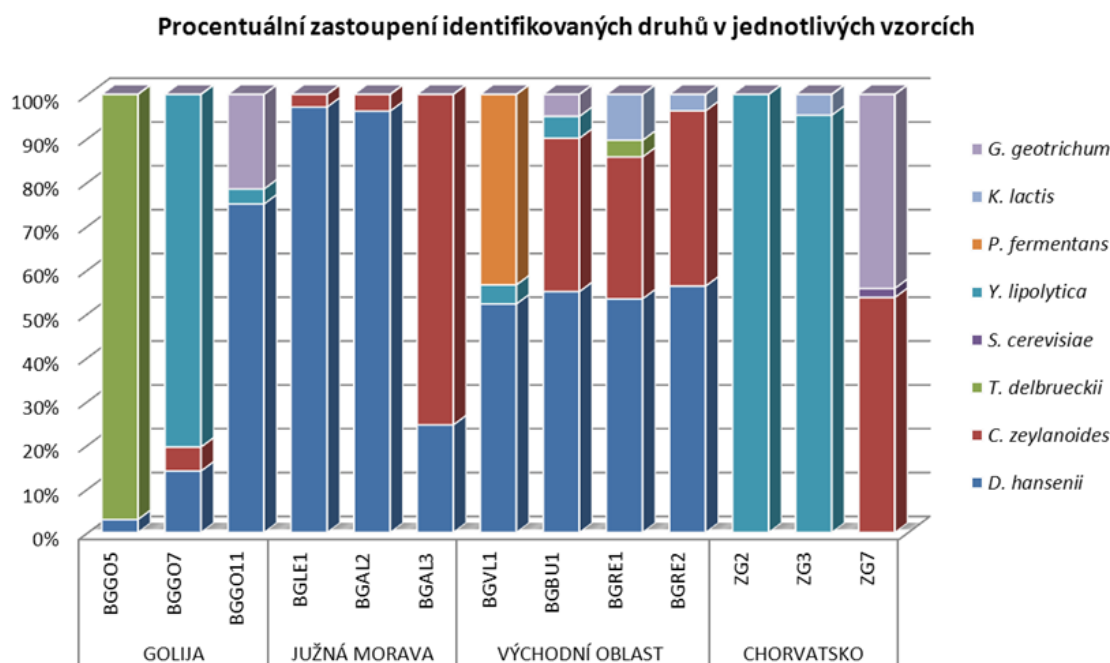
Izolované kmeny byly identifikovány molekulární metodou ITS-PCR-RFLP. Za použití tří restrikčních endonukleáz *HaeIII*, *HinfI* a *CfoI*, softwaru BioNumerics 6.6 a UPGMA klastrové analýzy byly kvasinky rozděleny do 21 skupin. Dendrogram a velikosti výsledných restrikčních fragmentů jsou uvedeny v rámci publikace uvedené v příloze 4. 92 kmenů spadalo do skupiny blíže příbuzných druhů

D. hansenii a *C. zeylanoides*. K odlišení těchto dvou druhů byly použity další dvě restriční endonukleázy – *DdeI* a *MseI*.

16 druhů bylo identifikováno tradičními fyziologickými testy (viz **tab. 26**, str. 96) a 68 izolovaných kmenů bylo podrobeno sekvenaci (sekvence oblasti D1/D2 LSU rDNA a oblasti ITS společně s D1/D2 oblastí). Sekvence byly vyhodnoceny za použití databáze NCBI Blast a vloženy do archivu EMBL nukleotidových sekvencí. Sekvence jsou dostupné pod ENA ID: HE660050 – HE660085; HE799657 – HE799676; HF545658 – HF545672. Izolované identifikované druhy byly uloženy ve sbírce průmyslových mikroorganismů ZIM, Slovinsko (označení kmenů ZIM 2394 – ZIM 2498). Ukázka sekvence vložené do databáze BLAST pro druh *Y. lipolytica* (uložené ve sbírce kvasinek ZIM pod sbírkovým číslem ZIM 2409) je v příloze 6.

Identifikováno bylo celkem 20 druhů kvasinek, z nichž 12 druhů bylo zastoupeno minoritně, tzn., že výskyt ve vzorku byl nižší než 2 %. Procentuální zastoupení identifikovaných dominantních druhů je znázorněno v **grafu 14**; celkové schéma v podobě bublinového grafu je uvedeno v příloze 4.

V každém vzorku bylo detekováno od tří do sedmi druhů (i s druhy minoritně zastoupenými). Identifikovány byly jak druhy běžně se vyskytující v sýrech (např. *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *Kl. lactis*, *G. geotrichum* aj.), tak i druhy, které mohou ukazovat na nedostatečné hygienické podmínky během produkce sýrů (*C. parapsilosis*, *Trichosporon* sp. aj.). Identifikovány byly následující druhy: *D. hansenii*, čtyři druhy rodu *Candida*, jmenovitě *C. zeylanoides*, *C. deformans*, *C. pararugosa*, *C. parapsilosis*, dále *Y. lipolytica*, *Kl. lactis*, *P. exigua*, *P. fermentans*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, *T. quercuum*, *Tr. gracile*, *Tr. ovoides*, *W. anomalus*, *Metschnikowia* sp. a kvasinkovitý mikroorganismus *G. geotrichum*. Taktéž byly izolovány basidiomycetní druhy *Cr. curvatus* a *R. mucilaginosa*. Dendrogram ukazující genetickou podobnost jednotlivých identifikovaných druhů sestrojený v programu BioNumerics 6.5 a velikosti restričních fragmentů jsou uvedeny v rámci přílohy 4.



Graf 14: Procentuální zastoupení dominantních druhů kvasinek (distribuce > 2 %) v jednotlivých vzorcích.

Druh *D. hansenii* bývá velmi často izolován ze zrajících sýrů a díky produkci antimikrobiálních metabolitů může snížit riziko znehodnocení sýrů způsobené druhy rodu *Clostridium* (Faticenti et al., 1983). Podle získaných výsledků byl druh *D. hansenii* dominantně zastoupený u některých sýrů vyrobených v Srbsku (BGG011, BGLE1, BGAL2 a v sýrech pocházejících z východní oblasti). U sýrů pocházejících z Chorvatska nebyl detekován a predominantním druhem byl druh *Y. lipolytica*. Ačkoli autoři Fadda et al. (2004) a Gardini et al. (2006) uvádí, že *Y. lipolytica* je běžně rozšířený druh spojovaný s výrobou sýrů, nebyl tento druh izolovaný ze všech analyzovaných vzorků a jeho výskyt byl predominantní jen u sýrů pocházejících z Chorvatska. Taktéž Bonetta et al. (2008) detekovali tento druh pouze u několika málo vzorků sýrů. Autoři Eliskases-Lechner a Ginzinger, 1995 a Prillinger et al., 1999 uvádí, že i přes to, že *Y. lipolytica* je považována za běžně se vyskytující druh často izolovaný ze sýrů, není dominantním druhem izolovaným ve stádiu zrání sýrů. Toto tvrzení je v souladu se získanými výsledky, kdy *Y. lipolytica* byla predominantní u jednodenních sýrů (ZG2 – 100 %, ZG3 – 95.9 %).

Zajímavostí je detekce nedávno popsaného druhu *T. quercuum* (0,4 %, izolovaný ze vzorku BGG05) (Wang et al., 2009). Z některých sýrů byl taktéž izolovaný kvasinkovitý mikroorganismus *G. geotrichum* přirozeně přítomný v čerstvém mléce. Tento druh je zajímavý díky mnoha odlišným metabolickým drahám, kdy výsledné produkty přispívají k chuti a aroma mnoha typů sýrů (Boutrou a Guéguen, 2005).

Z jednoho vzorku (ZG7) byl izolován druh *C. parapsilosis*, který jak uvádí Jacques a Casaregola (2008) je považován za oportunitního patogena, a který kvůli nízké schopnosti přežít v sýrech (adaptovat se na podmínky) bývá jen zřídka detekován. Nicméně, Suzzi et al. (2003) a Alessandria et al. (2010) taktéž izolovali tento druh z ručně vyráběných sýrů a Delavenne et al. (2011) z ovčího mléka. Izolovány byly i aerobní druhy jako *Cr. curvatus* (BGAL2) a *R. mucilaginosa* (BGLE1, BGAL2, BGAL3). Výskyt basidiomycetních kvasinek, jak uvádí Ayres (1970) a následně i Pereira-Dias et al. (2000) není ojedinělý, některé druhy bývají často nalezeny v čerstvém mléce. Izolovány byly taktéž dva druhy rodu *Trichosporon* způsobující mykózu vlasů (Sugita, 2011). Výše popsané druhy mohou být indikátory nedostatečných hygienických podmínek, kdy zdroje kontaminace jsou spojené s prostředím produkce mléčných výrobků a často pocházejí ze špatně sanitovaných stěn, podlah, vybavení, rukou nebo taky ze slaného roztoku, který se používá k solení sýrů (Viljoen et al., 2003).

Souhrnně lze říci, že diverzita kvasinek se jeví být závislá i na regionu; některé kmeny byly izolovány jen ze sýrů z určitých oblastí. Nejvíce rozšířenými druhy byl jednoznačně druh *D. hansenii* (u Srbských sýrů) a *Y. lipolytica* u sýrů pocházejících z Chorvatska. Tyto druhy byly taktéž druhy dominantními.

Původní výsledky získané v rámci této studie ukázaly, že ručně vyráběné tradiční chorvatské a srbské sýry jsou bohaté na populaci žádoucích kmenů kvasinek. Jak autoři Gori et al., 2012; Ferreira a Viljoen, 2003 uvádí, některé druhy kvasinek, jako je např. *D. hansenii*, *G. geotrichum* nebo *Y. lipolytica* mohou být použity jako startovací kultury. Izolované autochtonní kmeny byly uloženy ve sbírce průmyslových mikroorganismů ZIM za účelem možné pozdější aplikace jakožto startovací kultura. Aplikace kmenů s vhodnými technologickými vlastnostmi při výrobě zrajících sýrů vede ke kontrole procesu s možným docílením požadované textury a chuťových vlastností. Prvotním předpokladem pro aplikaci kmenů v průmyslu je však získání znalostí mikrobiální diverzity daných ručně vyráběných tradičních produktů z příslušných oblastí. Navíc izolace kmenů z určité geografické lokality může být eventuálně výsledkem produkce originálních sýrů s daným regionálním charakterem. Předpokládá se, že kmeny budou schopny produkovat organolepticky aktivní látky,

bioaktivní sloučeniny a zdraví prospěšné látky. To však vyžaduje další fyziologické a následně i technologické testování příslušných kmenů.

Tab. 26: Výsledky fyziologických testů reprezentativních kmenů po třech týdnech. F – fermentační testy; C, N – asimilační testy; T, O – růst při různých podmínkách; M – testy produkce.

Pf – *P. fermentans*; Yl – *Y. lipolytica*; Kl – *Kl. lactis*; T – *Torulaspora sp.*; Td – *T. delbrueckii*; Cc – *Cr. curvatus*; Wa – *W. anomalus*; Rm – *R. mucilaginosa*; Dh – *D. hansenii*; Tg – *Tr. gracile*; Gg – *G. geotrichum*; Cz – *C. zeylanoides*; Sc – *S. cerevisiae*; Cp – *C. parapsilosis*.
+ pozitivní, – negativní, w – slabý růst; 0 – test neproveden.

		REPREZENTATIVNÍ DRUHY KVASINEK															
		Pf	Yl	Kl	T	Td	Cc	Wa	Rm	Dh	Tg	Yl	Gg	Cz	Sc	Cp	Cp
F1	D-glukóza	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
F2	D-galaktóza	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F3	Maltóza	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
F5	Sacharóza	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
F8	Laktóza	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1	D-glukóza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C2	D-galaktóza	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
C3	L-sorbóza	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
C4	D-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	D-ribóza	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
C6	D-xylóza	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
C7	L-arabinóza	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
C8	D-arabinóza	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C9	L-rhamnóza	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C10	Sacharóza	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
C11	Maltóza	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
C12	α,α-trehalóza	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
C13	Meα-D-glucosid	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
C14	Celobióza	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
C15	Salicin	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
C16	Arbutin	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
C17	Melibióza	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C18	Laktóza	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C19	Rafinóza	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
C20	Melezitóza	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
C22	Škrob	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	Glycerol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C24	Erythritol	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C25	Ribitol	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
C26	Xylitol	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C27	L-arabinitol	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C28	D-glucitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
C29	D-mannitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
C30	Galaktikol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C31	myo-inositol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C32	D-glucono-1,5-lactone	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
C33	2-keto-D-glukonát	-	+	-	-	+	+	0	+	+	+	-	-	+	-	+	+
C35	D-glukonát	-	+	0	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
C36	D-glukuronát	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
C37	D-galakturonát	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
C38	DL-laktát	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
C39	Sukcinát	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
C41	Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C42	Ethanol	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
N1	Dusitany	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N2	Dusičnany	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
N3	Ethylamin	+	+	+	-	-	-	+	+	-	w	+	+	+	-	+	+
N4	L-lyzin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
N5	Cadaverin	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
T1	při 25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T2	při 30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T3	při 35 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4	při 37 °C	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
O1	0.01% cyclohex.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
O2	0.1% cyclohex.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O3	1% kys. octová	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O4	50% glukóza	-	-	w	+	+	-	+	w	+	-	-	-	-	-	+	+
O6	10% NaCl	+	+	+	+	w	-	+	w	+	-	+	-	+	-	+	+
O7	16% NaCl	-	-	w	-	-	-	+	-	w	-	-	-	+	-	+	+

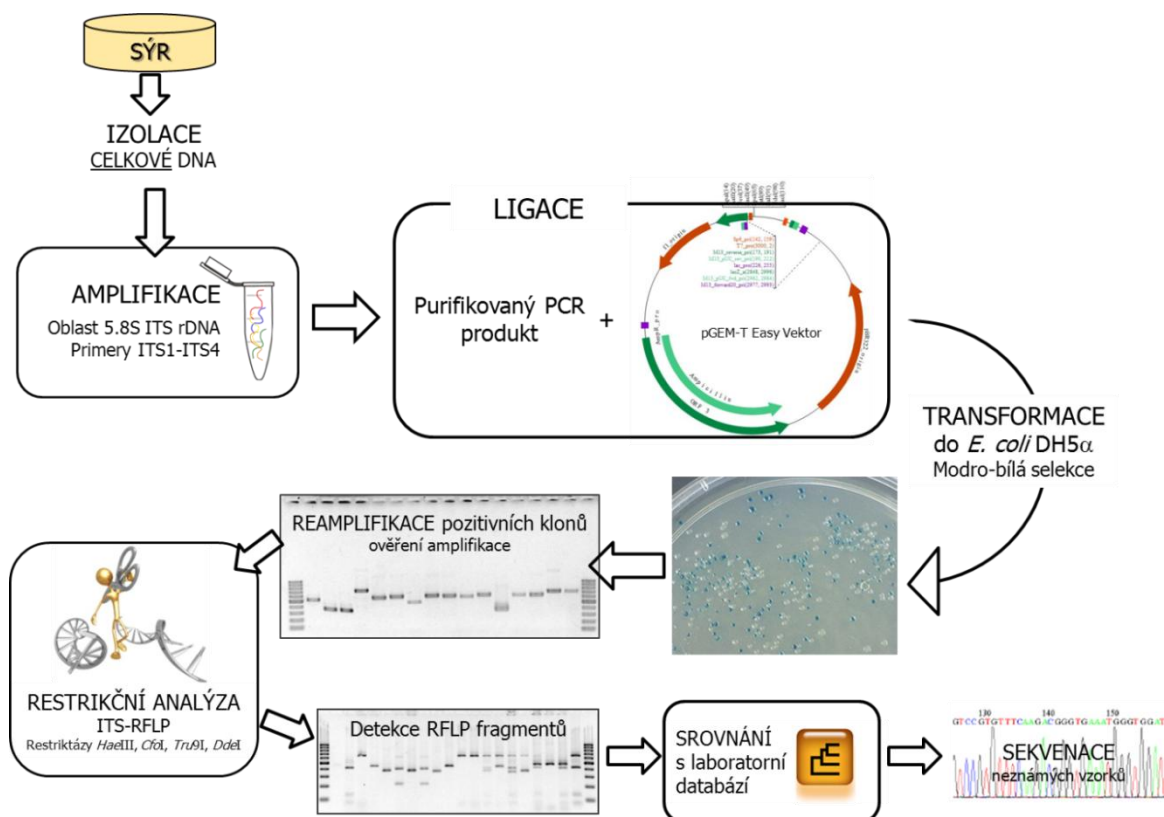
4.3.2 Zavedení přímé semi-kvantitativní identifikační metody

Za účelem přímé detekce komplexního mikrobiálního ekosystému zahrnujícího kvasinky a plísně, byly aplikovány metody přímé analýzy DNA, které nejsou závislé na předchozí kultivaci mikroorganismů a analyzují kompletní ekosystém sestávající z živých kultivovatelných, živých nekultivovatelných a mrtvých buněk. K detekci kvasinek byly použity metody přímé identifikace: LSU-DGGE a nově navržená metoda založená na konstrukci knihovny z metagenomové DNA. Tyto metody byly srovnány s kulturačně závislou metodou ITS-PCR-RFLP. Při aplikaci nové metody se vycházelo z faktu, že techniky založené na klonování jsou považovány za nepostradatelný nástroj při studiu bakteriální ekologie, nicméně jejich použití ve studiích zabývajících se eukaryotickou mikroflórou bylo doposud značně omezeno. Navíc většina metod přímé analýzy DNA (např. DGGE/TGGE) izolované z daného prostředí postrádá informace o poměru každého druhu ve vzorku, což je důležitým krokem při posouzení druhové dominance apod.

Jako matrice byly zvoleny sýry a jejich meziprodukty. Mikrobiální komunity sýrů jsou totiž v porovnání s jinými matricemi (např. mošt) méně komplexní v souvislosti s rozmanitostí kvasinek a tudíž se podle Jany a Barbier (2008) stávají ideálním systémem při testování nových metod. Stejně jako v předchozí části disertační práce byly zvoleny tradičně vyráběné sýry pocházející ze dvou oddělených farem lokalizovaných ve východní části Srbska (značeny L1 – lokalita 1; L2 – lokalita 2). U těchto sýrů, vyráběných z nepasterizovaného mléka bez přídavku startovací kultury, jsme očekávali vyšší diverzitu v porovnání s komerčně dostupnými sýry. Specifikace sýrů a jejich meziproduktů jsou uvedeny v **tab. 25**. Původní výsledky, které byly odeslány k recenznímu řízení do mezinárodního impaktovaného časopisu, jsou uvedeny v rámci přílohy 5 a v této kapitole jsou shrnuty.

Z hlediska produkce sýrů je důležité charakterizovat celý mikrobiální ekosystém sestávající z kvasinek, protože některé druhy metabolicky aktivních kvasinek nemusí růst na klasicky používaných médiích, anebo jejich fyziologický stav jim nedovoluje soutěžit s jinými druhy (Quigley et al., 2011). Taktéž výrazně nižší koncentrace určitých druhů ve vzorku v porovnání s druhy početně dominantními nemusí být vždy detekovány. Výrazné nedostatky metod spojených s kultivací řeší právě metody založené na detekci celkové DNA přímo extrahované z prostředí vzorku (Cocolin et al., 2013). Jak již bylo zmíněno, tyto metody často postrádají informaci o poměru druhů ve vzorku a současně mají vyšší limit detekce než metody závislé na kultivaci. Na základě těchto limitací a za účelem kvantifikace byla zavedena metoda ITS genomová knihovna spojená s následnou restriční analýzou, která umožňuje stanovit druhové procentuální zastoupení, a u které se očekává, že detekční limit metody bude nižší z hlediska její vyšší citlivosti než u LSU-DGGE.

Nově navržená metoda (**obr. 28**) je založená na souboru DNA klonů zkonstruovaných *in vitro* vložením ITS amplikonů do klonovacího plazmidu. Tento metagenomový přístup začíná izolací celkové DNA ze vzorku, následnou amplifikací úseku ITS rDNA, klonováním do plazmidu a transformací do hostitelské bakterie *E. coli* DH5 α . Rekombinantní DNA je posléze reamplifikována a podrobena restriční analýze. Oblast ITS rDNA byla vybrána z důvodu existence rozsáhlé databáze ITS restričních profilů mnoha druhů kvasinek. Navíc v dnešní době je taktéž dostupná široká databáze sekvencí oblasti ITS kvasinkové rDNA a díky vyhledání sekvencí požadovaných druhů se dají následně za použití programu pDRAW32 simulovat velikosti restričních fragmentů, čehož bylo využito při identifikaci neznámých amplikonů. To vše snižuje finanční a časovou náročnost spojenou se sekvenací většího počtu vzorků. Na závěr je možné sekvenovat pouze neznámé vzorky. Aplikovaná metoda byla srovnána s metodou LSU-DGGE a klasickou ITS-PCR-RFLP.



Obr. 28: Schematické znázornění pracovního postupu nově navržené přímé detekce kvasinek v potravinách – metoda ITS-genomová knihovna.

V práci bylo analyzováno celkem 7 vzorků, z toho 3 vzorky sýrů a vždy po dvou vzorcích syrovátky a slaného nálevu. Kvasinky byly kultivovány na YPD médiu a zároveň byla ze vzorků přímo izolována celková DNA. Celkový počet kvasinek (**graf 15**) v analyzovaných vzorcích sýrů se pohyboval v rozmezí od 4 do 6 log CFU·g⁻¹, kdy koncentrace buněk byla nejvyšší u 10-ti denního sýru, což poukazuje na metabolickou aktivitu kvasinek během procesu zrání. U jednodenního a třídního sýru byly koncentrace srovnatelné (4 log CFU·g⁻¹). U meziproductů se koncentrace významně lišily.

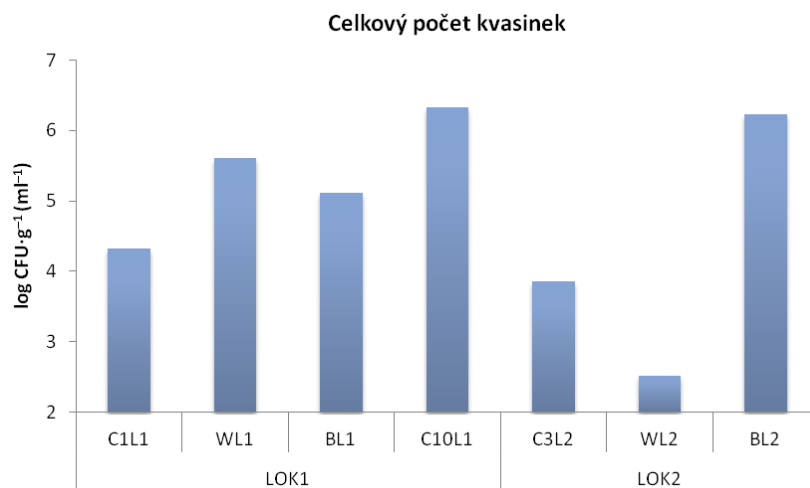
Kvasinky byly morfologicky rozděleny do skupin a 78 izolátů bylo identifikováno metodou ITS-PCR-RFLP za použití stejných restričních endonukleáz jako v kapitole 4.3.1. Reprezentativní vzorky (vždy jeden z příslušné skupiny vzniklé vyhodnocením restričních profilů za použití programu BioNumerics 6.6 a UPGMA klastrové analýzy) byly dále identifikovány tradičními fyziologickými testy a podrobeny D1/D2 LSU rDNA sekvenaci. Příprava vzorku na sekvenaci oblasti D1/D2 LSU rDNA (amplikon dlouhý 250 bp) probíhala klonováním do plazmidu. Získané a vyhodnocené sekvence byly vloženy do databáze sekvencí (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) a jsou uvedeny pod identifikačními čísly HE660050 – HE660085. Kmeny byly taktéž uloženy ve sbírce průmyslových mikroorganismů ZIM, Slovinsko a jsou dostupné pod sbírkovými čísly ZIM 2394 – 2498.

Co se týče diverzity izolovaných druhů (identifikované metodou ITS-PCR-RFLP), tak druh *D. hansenii* a *C. zeylanoides* byly predominantními druhy; na druhou stranu *Kl. lactis* byl izolován pouze z lokality L1, kde ve vzorcích WL1 a BL1 byl nedominantně zastoupený (relativní zastoupení druhu bylo kolem 90 % u obou vzorků). Druhy *Y. lipolytica* a *G. geotrichum* byly detekovány pouze u sýru pocházejícího z lokality L2. Všechny detekované druhy se nacházely i u sýrů zpracovaných v části 1 (kapitola 4.3.1). Plísně nebyly kultivačními technikami detekovány.

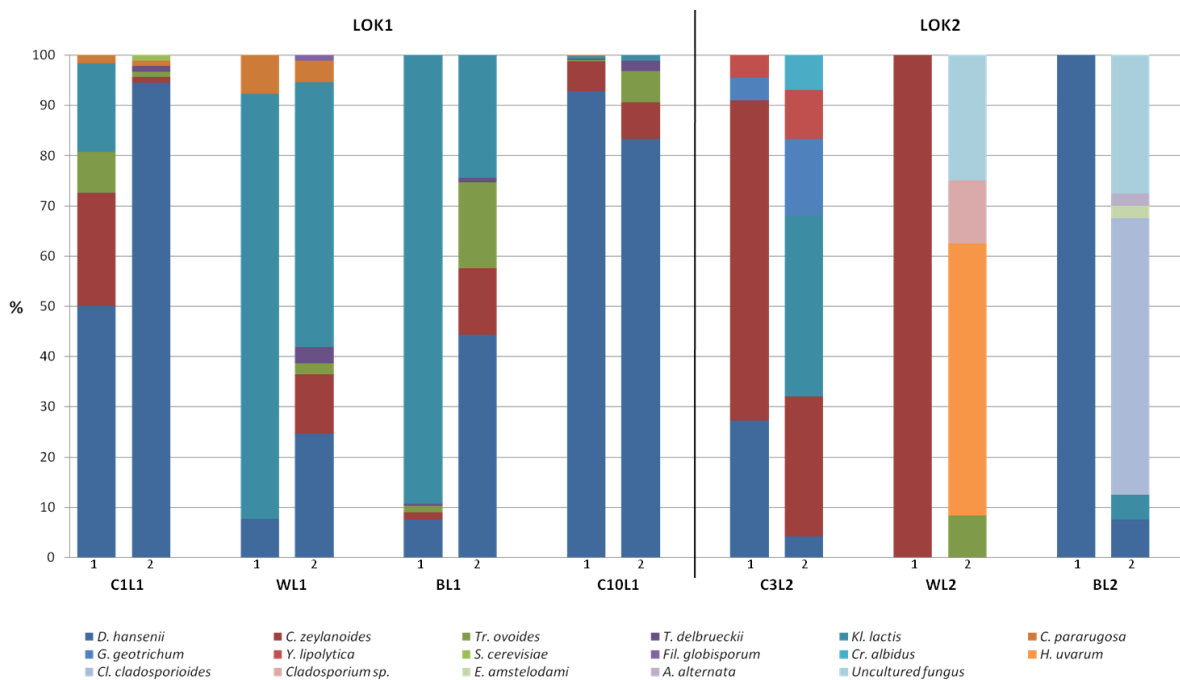
Metodou LSU-DGGE byly detekovány druhy, které byly zároveň identifikovány kultivačně závislými metodami. Získané LSU-DGGE pásy byly z gelu extrahovány, přečištěny, reamplifikovány, připraveny na sekvenaci (klonování do plasmidu) a sekvenovány. Výsledky DGGE gelu, stejně jako tabulka se sekvenovanými druhy a druhy detekované v jednotlivých vzorcích, jsou uvedeny podrobně v příloze 5. Nejvíce zastoupenými druhy byly *D. hansenii* a *Kl. lactis*. *C. zeylanoides* se vyskytovala téměř ve všech vzorcích, nicméně intenzita pásů na gelu nebyla tak vysoká jako u předchozích dvou druhů. Kromě kvasinkových druhů byla detekována i plíseň *Cladosporium* sp. a z důvodu použití univerzálních eukaryotických primerů i rostlinnou DNA (*Arabidopsis* sp., *Ramularia* sp.). Autoři Cocolin et al. (2013), Prakitchaiwattana et al. (2004) a Delavenne et al. (2011) uvádí detekční limit metody DGGE 10^3 CFU·ml⁻¹ (g⁻¹). U testovaných vzorků se detekční limit metody LSU-DGGE pohyboval v rozmezí 10^2 – 10^3 CFU·ml⁻¹ (g⁻¹). Podle získaných výsledků by však detekční limit mohl korelovat s přítomností dominantních druhů. Například u vzorků C1L1, B1L1 se koncentrace mezi dominantními druhy a druhy méně zastoupenými lišila 10 – 100 ×, ve vzorku byly identifikovány všechny druhy detekované taktéž metodou ITS-PCR-RFLP. Jestliže se však koncentrace zastoupených druhů lišila v porovnání s dominantními druhy 1000 ×, druhy minoritně zastoupené nebyly metodou DGGE detekovány.

Aplikace metody založené na konstrukci ITS genomové knihovny spojené s restrikční analýzou umožnila stanovit relativní zastoupení druhů v daném vzorku. Relativní zastoupení druhů identifikovaných jak kultivačně závislou ITS-PCR-RFLP metodou, tak i nově aplikovanou metodou nezávislou na kultivaci je uvedeno v **grafu 16** a souhrnně v příloze 5 v tabulce 4. Touto metodou byly detekovány všechny druhy, které byly identifikovány metodou ITS-PCR-RFLP. Navíc některé druhy byly identifikovány výhradně touto metodou, což poukazuje na jejich nízké zastoupení ve vzorku, nemožnost kultivace či nízkou viabilitu buněk. Jedná se o následující druhy: *Cr. albidus*, *H. uvarum*, *F. globisporum* a *S. cerevisiae*. Taktéž byly identifikovány i plísně *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata* a *Eurotium amstelodamii*, které ve studii týkající se mikrobiální ekologie čerstvého mléka a speciálních sýrů detekovali i Lavoie et al. (2012). Korelační analýza (viz **graf 17**) obou přístupů (ITS-PCR-RFLP a ITS genomové knihovny spojené s restrikční analýzou) ukázala, že obě metody jsou jen částečně konzistentní (Pearsonův koeficient je 0,55 – střední hodnota shody), což potvrzuje částečnou odlišnost obou přístupů. Navržená nekultivační metoda nese řadu dalších výhod. Metoda se zdá být citlivější než běžně používané techniky aplikované při studiu mikrobiální ekologie (v našem případě LSU-DGGE a klasická ITS-PCR-RFLP). Celkem 17 druhů bylo identifikováno metodou ITS genomové knihovny; metodou LSU-DGGE bylo identifikováno 10 druhů a metodou ITS-PCR-RFLP 8 druhů. Taktéž detekční limit metody je nižší a to do 10^2 CFU·ml⁻¹ (g⁻¹) a na rozdíl od LSU-DGGE byly detekovány i minoritně zastoupené druhy, jejichž koncentrace se lišila 1000 ×. Na vyšší senzitivitu taktéž poukazuje skutečnost, že ve vzorku WL1 bylo identifikováno téměř dvakrát více druhů než u kultivační metody ITS-PCR-RFLP a nekultivační LSU-DGGE. Navíc značně vyšší Shannonův-Wienerův index diverzity (H') u většiny vzorků (6 ze sedmi, viz **graf 18**) potvrzuje taktéž vyšší citlivost metody.

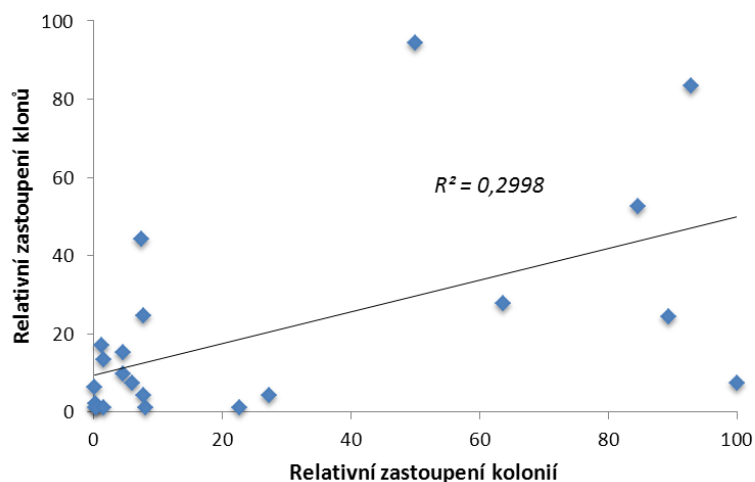
Na druhou stranu však může provázet nově navrženou metodu i řada nevýhod. Jedná se např. o extrakci DNA, která je mnohdy spjata s výskytem přirozených sloučenin, jako jsou tuky, soli, apod., což může ve výsledku inhibovat PCR. Nutným krokem je tedy izolace DNA v dostatečné koncentraci a vysoké kvalitě. Acinas et al. (2005) taky poukazuje na nedostatky a možné zkreslení dat během amplifikace metodou PCR (upřednostňování DNA zastoupené ve vyšší koncentraci). Taktéž je nutné zmínit i účinnost klonování, která nemusí být stoprocentní.



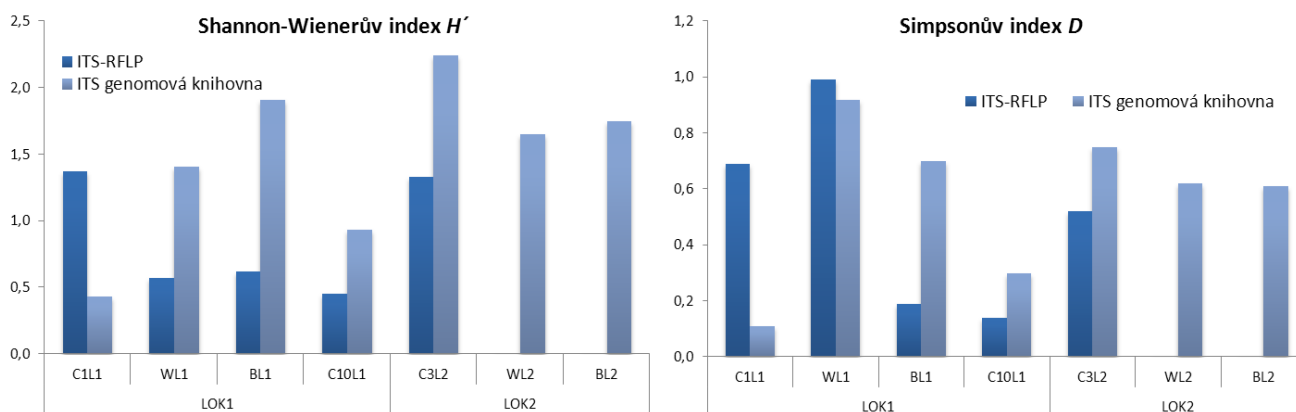
Graf 15: Celkový počet kvasinek v jednotlivých vzorcích rozdělených podle lokalit. Pro sýry v log CFU·g⁻¹ a pro meziproducty v log CFU·ml⁻¹. Směrodatné odchylky nebyly větší jak 10 %.



Graf 16: Relativní zastoupení kvasinkových druhů identifikovaných: 1 – kultivačně závislou ITS-PCR-RFLP metodou; 2 – semi-kvantitativní metodou ITS genomové knihovny, která je nezávislá na předchozí kultivaci. LOK1 (L1) a LOK2 (L2) značí lokality odběru.



Graf 17: Korelace mezi relativním zastoupením druhů stanoveným metodou ITS-PCR-RFLP (osa X) a metodou ITS genomové knihovny (osa Y). R^2 , regrese. Hodnota Pearsonova koeficientu je $r = 0,55$, p hodnota je 0,008.



Graf 18: Grafické znázornění porovnání metod z hlediska klasických indexů diverzity.

Kompletní charakterizace mikroflóry kvasinek a vláknitých hub v sýrech a jejich meziproduktech umožnila komplexnější identifikaci těchto komunit. Relativní zastoupení druhů identifikovaných kulturační ITS-PCR-RFLP metodou a nekulturační ITS genomovou knihovnou spojenou s RFLP je uvedeno v tab. 4 v příloze 5 společně s metodou LSU-DGGE. Vyšší diverzita populací byla sledována u matric z lokality L1, Glavičák. Navíc některé druhy jako je *Kl. lactis*, *C. pararugosa*, *T. delbrueckii* a *Tr. ovoides* byly izolovány jen ze sýrů z oblasti L1, Glavičák. Na druhou stranu *G. geotrichum* a *Y. lipolytica* byly detekovány v sýrech pocházejících z lokality L2, Bučina. Druhy *D. hansenii* a *C. zeylanoides* byly přítomny ve všech vzorcích sýrů. Tyto druhy byly predominantní taktéž i u dalších sýrů pocházejících ze Srbska a analyzovaných v rámci části 1.

Z výsledků vyplývá, že kulturačně nezávislá metoda ITS genomová knihovna, se jeví být citlivější v porovnání s kulturačními technikami a s nekulturační LSU-DGGE. Metoda nabízí možnost detekce vyšší druhové diverzity než při aplikaci klasických izolačních metod. Tato studie založená na analýze sekvencí DNA obdržené přímo ze vzorku nabízí nový pohled na mikrobiální diverzitu a otevírá nové

perspektivy při přímé komplexní analýze kvasinek a plísní ve vzorcích. I přes to, že techniky založené na kultivaci kvasinek jsou stále považovány za standardní metody identifikace, nově navržená metoda přímé detekce kvasinek by mohla být její alternativou. Nicméně tato prvotní studie vyžaduje ještě další testování a je potřeba ji ještě aplikovat na další komplexnější systémy apod.

- V práci byly identifikovány kvasinky izolované z bobulí a spontánně kvašených moštů připravených z bobulí pocházejících z konvenční, integrované a ekologické produkce. K identifikaci jak saccharomycetních, tak i nesaccharomycetních kmenů byly použity metody založené na PCR (ITS-PCR-RFLP, sekvenace, LSU-DGGE). Nalezeny byly druhy běžně se vyskytující na bobulích a v moštích.
- V průběhu kvasného procesu byla porovnána kvasinková populace u moštů připravených z integrované a ekologicky ošetřených bobulí. Korelace mezi relativním zastoupením izolovaných druhů z moštů připravených z integrované ošetřených bobulí a moštů z ekologicky ošetřených bobulí ukázala rozdíly mezi integrovanou a ekologickou produkcí ve vztahu ke kvasinkové populaci. Rozdíly byly však zřejmé v průběhu kvasného procesu, což může ukazovat na rozdílné kmenové zastoupení, odlišný obsah určitých látek v moštu, který může mít vliv na kvasinkovou populaci a na sekundární mikroflóru, která do procesu vstupuje při zpracování bobulí na mošt a ze sklepa.
- Za účelem zavedení vhodné metody k identifikaci kmenů *S. cerevisiae* byla aplikována řada molekulárních typizačních metod (PCR-RFLP; PCR-fingerprinting, druhově specifické primery, LSU-DGGE aj.). I přes to, že identifikace komplexu *Saccharomyces sensu stricto* je obtížná, byla zavedena metoda kmenové identifikace druhu *S. cerevisiae*. Metoda ITS-PCR-RFLP za použití primerů ITS1 – ITS4 dokázala odlišit rod *Saccharomyces* od ostatních nesaccharomycetních druhů. Druh *S. cerevisiae* je možné od ostatních druhů komplexu *Saccharomyces sensu stricto* odlišit druhově specifickými primery, které amplifikují pouze rDNA tohoto druhu. Amplifikací delta oblastí rDNA druhu *S. cerevisiae* za použití primerů $\delta 1$ - $\delta 2$ je pak možné odlišit jednotlivé kmeny. Tato kombinace metod umožnila komplexní analýzu izolátů *S. cerevisiae* a to dokonce až na kmenové úrovni.
- Aplikací metod popsaných výše byly kmenově charakterizovány druhy rodu *Saccharomyces* izolované v průběhu let 2009 – 2011 z bobulí a spontánně kvašených moštů. Amplifikací delta sekvencí byly odlišeny kmeny *S. cerevisiae*. Z celkového počtu 120 izolátů řadících se druhově jako *S. cerevisiae* bylo identifikováno 45 odlišných kmenů.
- Byly zavedeny metody ke stanovení vybraných oenologických vlastností k posouzení vhodnosti kmenů pro výrobu vína (alkoholová tolerance, osmotolerance, killerova aktivita, schopnost flokulovat, produkce H₂S aj.). 15 kmenů *S. cerevisiae* z celkového počtu 45 testovaných kmenů ukázalo lepší technologické vlastnosti než komerčně dostupný kmen *S. cerevisiae* BS6.
- Jeden izolovaný autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09 (izolovaný z ekologicky ošetřených bobulí odrůdy Sauvignon) byl zaveden do praxe v rámci velkoobjemové fermentace. Kvasný proces byl monitorován z hlediska rozvoje kvasinkové populace zahrnující saccharomycetní i nesaccharomycetní druhy. Stanoven byl celkový počet kvasinek a jednotlivé izoláty byly identifikovány. V průběhu fermentačního procesu byly u moštu stanoveny základní chemické parametry, jako je pH, koncentrace redukcujících sacharidů a ethanolu, celkové titrovatelné kyseliny, čímž byl posouzen daný fermentační proces. Na základě výsledků autochtonní kmen *S. cerevisiae* 1-09 ukázal podobný fermentační profil jako kontrolní komerčně dostupný kmen *S. cerevisiae* BS6.

- Na závěr bylo provedeno sensorické zhodnocení výsledných produktů. Výsledek sensorického hodnocení ukázal, že izolovaný kmen *S. cerevisiae* 1-09 se jeví být vhodný k zakvášení moštů a k produkci vín z hlediska výsledného sensorického charakteru, který se výrazně neodlišoval od vín připravených inokulací moštů komerční kulturou. Získané výsledky mohou být podkladem pro získání VOC certifikátu (víno originální certifikace).
- V další části práce byla izolována, kvantifikována a identifikována kvasinková mikroflóra ze vzorků tradičních ručně vyráběných sýrů pocházejících ze Srbska a Chorvatska. Kvasinky byly identifikovány metodou ITS-PCR-RFLP, stejně jako v případě identifikace vinných kvasinek, dále pak tradičními fyziologickými testy a sekvenací.
- Identifikovány byly druhy běžně spojované s prostředím sýrů. U sýrů pocházejících ze Srbska byl predominantním druhem druh *D. hansenii*, naopak u sýrů vyrobených v Chorvatsku byl detekován jako predominantní druh *Y. lipolytica*. Taktéž byly z některých vzorků izolovány i druhy *C. parapsilosis* a *Trichosporon* sp., které ukazují na nedostatečné hygienické podmínky při výrobě sýrů.
- Vybrané izolované a identifikované druhy byly zařazeny do sbírky průmyslových mikroorganismů ZIM, Slovinsko.
- Dále byla zavedena nová metoda ITS genomová knihovna spojená s restriční analýzou klonů. Tato metoda nebyla dříve použita za účelem charakterizace kvasinek/plísní i přes to, že se jedná o široce používanou techniku charakterizace bakteriální diverzity zejména v přirozených prostředích. Metoda je kultivačně nezávislá, odpadá tedy časová náročnost spojená s izolací a získáním čistých kultur kvasinek.
- Navržená metoda byla srovnána s kultivačně závislou ITS-PCR-RFLP metodou pomocí korelační analýzy. Výsledky korelační analýzy naznačují, že metody ITS genomová knihovna spojená s RFLP a ITS-PCR-RFLP nejsou zcela konzistentní, přičemž rozdíly pravděpodobně vycházejí z odlišných přístupů (kultivačně nezávislá/závislá metoda).
- Navrženou metodu doprovází řada výhod. Metoda je semi-kvantitativní, umožňuje stanovit relativní zastoupení druhů ve vzorku. Za zmínku stojí i nižší limit detekce v porovnání s LSU-DGGE a ITS-PCR-RFLP.
- Metoda ITS genomová knihovna umožnila stanovit až 2 krát více druhů než kultivačně závislá ITS-PCR-RFLP, což potvrzují i stanovené diverzitní koeficienty. Metoda se jeví být vhodná pro rychlou detekci komplexních mikrobiálních systémů zahrnujících kvasinky a plísně.
- I přes to, že techniky založené na kultivaci kvasinek jsou stále považovány za standardní metody identifikace, nově navržená metoda přímé detekce kvasinek by mohla být její alternativou. Je však nezbytné dále metodu ověřit na dalších systémech a na větším souboru vzorků a matic.

V rámci první části předložené disertační práce byly identifikovány kvasinky izolované z moštů připravených z konvenčně (Veltlín zelený), integrovaně a ekologicky (Sauvignon a Rulandské modré) ošetřených bobulí. Za účelem identifikace byla volena metoda ITS-PCR-RFLP, sekvenace, LSU-DGGE. Izolovány byly druhy *H. uvarum*, *S. cerevisiae*, *Pichia* sp., *Candida* sp. aj, které se běžně vyskytují v moštech. V další části práce byly zavedeny metody, které jsou nezbytné pro selekci a následnou aplikaci kmenů *S. cerevisiae* jakožto startovací kultury při výrobě tradičních moravských vín. Jedná se o izolaci a získání čistých kmenů, jejich identifikaci, která představuje komplikovaný krok v důsledku složitosti odlišení již samotných druhů komplexu *Saccharomyces sensu stricto* (zahrnuje vinařské kmeny), dále se jedná o charakterizaci příslušného kmene (stanovení oenologických neboli technologických vlastností) a o ověření kmene v praxi při velkoobjemové fermentaci. Kombinace molekulárních typizačních metod zahrnujících ITS-PCR-RFLP, PCR-fingerprinting, druhově specifické primery umožnila identifikovat některé druhy komplexu *Saccharomyces sensu stricto*. Navíc amplifikace delta oblastí rDNA kvasinek za použití páru primeru $\delta 1$ - $\delta 2$ umožnila kmenovou identifikaci druhu *S. cerevisiae*. Jednotlivé identifikované autochtonní kmeny *S. cerevisiae* byly testovány na vhodné oenologické vlastnosti, které jsou nedílnou součástí zavedení příslušného kmene do praxe. Na základě dobrých technologických vlastností (osmotolerance, alkoholová tolerance, nízká produkce H_2S apod.) byl vybrán kmen *S. cerevisiae* 1-09 izolovaný ze samotných bobulí pocházejících z vinice. Tento kmen byl posléze testován v malém objemu moštu a následně i při velkoobjemové fermentaci. Na základě sledované chemické a posuzované senzorycké analýzy byla na závěr posouzena vhodnost kmene pro výrobu konkrétního vína. Vína připravená inokulací moštu autochtonním kmenem *S. cerevisiae* 1-09 se významně nelišila od vín, která byla připravena inokulací moštu komerčně dostupným kmenem. Aplikace selektovaných autochtonních kmenů při výrobě vín nabízí možnost zachování autenticity neboli originality daného produktu. Na základě zájmu o selekci autochtonních kmenů i jinými moravskými vinařstvími byla navázána další spolupráce. Závěrem lze tedy říci, že byl zaveden komplexní proces aplikace selektovaných kmenů ve vinařském průmyslu.

V další části disertační práce, která byla řešena v rámci studijního pobytu na Univerzitě v Lublani, Slovinsko, byla pozornost upřena na kvasinky izolované z tradičních ručně vyráběných sýrů pocházejících ze zemí západního Balkánu (Srbsko, Chorvatsko). Za účelem identifikace původní mikrobiální kvasinek tradičních sýrů, byly aplikovány jak molekulárně biologické metody, které byly použity i při analýze vína (ITS-PCR-RFLP; parciální sekvenace), tak i tradiční fyziologické testy. Kvantifikace kvasinkové mikrobiální populace a stanovení diverzity koeficientů umožnily analýzu jednotlivých vzorků sýrů z hlediska mikrobiální populace v závislosti na lokalitě jejich původu. Izolované a identifikované kmeny byly zařazeny do sbírky mikroorganismů ZIM, Slovinsko. V poslední části práce byla za účelem přímé detekce komplexního mikrobiálního systému zahrnujícího kvasinky a plísňe, využita metoda přímé analýzy DNA, která není závislá na předchozí kultivaci mikroorganismů. Navržená metoda – ITS genomová knihovna spojená s restriční analýzou – umožňuje na rozdíl od jiných kultivačně nezávislých metod stanovit relativní zastoupení jednotlivých druhů ve vzorku. Metodu doprovází taktéž nižší limit detekce v porovnání s přímou metodou LSU-DGGE a kultivačně závislou ITS-PCR-RFLP. V některých případech nově navržená metoda umožnila stanovit až dvakrát více druhů, což potvrzovaly i stanovené diverzity koeficienty. Metoda ITS genomová knihovna spojená s restriční analýzou se zdá být alternativou k ITS-PCR-RFLP a jistě by bylo zajímavé aplikovat metodu na složitější systémy, jako je např. víno.

Všechny použité metody včetně nově zavedené nekultivační techniky identifikace kvasinek lze využít k jejich detekci z jakýchkoliv potravinových matric a jiných přirozených prostředí.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ACINAS, G.S., SARMA-RUPAVTARM R., KLEPAC-CERAJ V., POLZ F.M. PCR-induced sequence artifacts and bias: Insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, v. 71, s. 8966-8969. Doi:10.1128/AEM.71.12.8966-8969.2005.
- ADDIS, E., FLEET, G.H., COX, J.M., KOLAK, D., LEUNG, T. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, v. 69, s. 25-36. Doi: 10.1016/S0168-1605(01)00569-4.
- ALCOBA-FLÓREZ, J., ARÉVALO-MORALES, M., PÉREZ-ROTH, E., LAICH, F., RIVERO-PÉREZ, B., MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Yeast molecular identification and typing. *Communication Current Research and Educational topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007, s. 535 - 546.
- ALESSANDRIA, V., DOLCI, P., RANTSIOU, K., PATTONO, D., DALMASSO, A., CIVERA, T., COCOLIN, L. Microbiota of the Planalto de Bolona: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, v. 26, s. 2211 – 2221. Doi: 10.1007/s11274-010-0406-7.
- ALEXANDRE, H., ANSANAY-GALEOTE, V., DEQUIN, S., BLONDIN, B. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 2001, v. 498, s. 98-103.
- BAILERAS COUTO, M.M., EISMA, B., HOFSTRA, H. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*. 1996, v. 62, s. 41 – 46.
- BARATA, A., MALFEIRO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, v. 3, s. 243-259. doi: 10.1016/j.ijfoofmicro.2011.11.025.
- BARNETT, J, R PAYNE a D YARROW. *Yeasts: characteristics and identification*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 1990, ix, 1002 p. ISBN 05-213-5056-5.
- BARNETT, J, R PAYNE a D YARROW. *Yeasts: characteristics and identification*. 3rd ed. New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2000, ix, 1139 p. ISBN 05-215-7396-3.
- BARRAJÓN, N., ARÉVALO-VILLENA, M., ÚBEDA, J., BRIONES, A. Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011, v. 27, s. 2703-2710. Doi:10.1007/s11274-011-0744-0.
- BAUER, F., PRETORIUS, I. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *South African Journal of Enology Viticulture*, 2000. Vol. 21, pp. 27 – 51.
- BENITO, S., MORATA, A., PALOMERO, F., GONZÁLEZ, M.C., SUÁREZ-LEPE, J.A. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Sacchromyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chemistry*. 2011, v. 124, s. 15 – 23.
- BHADRA, B., SREENIVAS RAO, R., NAVEEN KUMAR, N., CHATURVEDI, P., SARKAR, P.K., SHIVAJI, S. *Pichia cecembensis* sp. nov. isolated from a papaya fruit (*Carica papaya* L., *Caricaceae*). *FEMS Yeast Research*. 2007, v. 7, s. 579-84. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00215.x.
- BINETTI, A., CARRASCO, M., REINHEIMER, J, SUÁREZ, V.: Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. *Journal of Applied Microbiology*. 2013, v. 115, s. 434-444. Doi: 10.1111/jam.12228.
- BINTSIS, T., LITOPOULOU TZANETAKI, E., DAVIERS, R., ROBINSON, R.K. Microbiology of fines used to mature feta cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2000, v. 53, s. 106-114.
- BISSON, L. The biotechnology of wine yeasts. *Food Biotechnology*. 2004, v. 18, s. 63 – 96. DOI: 10.1081/FBT-120030385.
- BOEKHOUT, T., ROBERT, V., SMITH, M., STALPERS, J., YARROW, D., BOER, P., GIJSWIJT, G., KURTZMAN, C., FELL, J., GUE´HO, E., GUILLOT, J., ROBERTS, I. Yeasts of the World—Morphology, Physiology, Sequences and Identification. CD-ROM from ETI Information Services, Wokingham, UK. 2002 – z publikace

- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. Spoilage yeasts in the wine industry. Review. *International Journal of Food Microbiology*, 2003. v. 86, s. 23-50. doi:10.1016/S0168-1605(03)00246-0.
- BOEKHOUT, T., ROBERT, V. *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*. Boca Raton: CRC Press, 2003, 488 s. ISBN 08-493-1926-9.
- BOER, V.M., DE WINDE, J.H., PRONK, J.T., PIPER, M.D. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulphur. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, v. 278, s. 3265-3274. Doi: 10.1074/jbc.M209759200.
- BONETTA, S., BONETTA, S., CARRARO, E., RANTSIOU, K., COCOLIN, L. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology*. 2008, v. 25, s. 786–92. doi:10.1016/j.fm.2008.04.013.
- BOULTON, R.B., SINGLETON, V.L., BISSON, L.F., KUNKEE, R.E. *Principles and practices of winemaking*. Chapman and Hall, New York. 1996. 613 s. ISBN 0-8342-1270-6.
- BOURDICHON, F., CASAREGOLA, S., FARROKH, CH., FRISVAD J.C., GERDS M.L., HAMMES W.P., HARNETT, J. *et al.* Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, v. 154, s. 87 – 97. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030.
- BOUTROU, R., GUÉGUEN, M. Interest in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, v. 102, s. 1 – 20. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028.
- CAPECE, A., ROMANIELLO, R., SIESTO, G., PIETRAFESA, R., MASSARI, C., POETA, C., ROMANO, P. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, V. 144, S. 187-192. DOI: 10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.09.009.
- CAPECE, A., SALZANO, G., ROMANO, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 84, s 33–39. Doi: 10.1016/S0168-1605(02)00392-6.
- CAPECE, A., FIORE, C., MARAZ, A., ROMANO, P. Molecular and technological approaches to evaluate strain diversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, v. 98, s. 136-144. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02434.x
- CAPOZZI, V., SPANO, G. Food microbial biodiversity and “microbes of protected origin”. *Frontiers in Microbiology*. 2011, v. 2, s. 237. Doi: 10.3389/fmicb.2011.00237.
- CARREIRA, A., PALOMA, L., LOUREIRO, V. Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, v. 41, s. 223-230.
- CARUSO, M., CAPECE, A., SALZANO, G., ROMANO, P. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Letters in Applied Microbiology*. 2002, v. 34, s 323–328. Doi: 10.1046/j.1472-765X.2002.01090.x.
- CIANI, M., COMITINI, F., MANNAZZU, I., DOMIZIO, P. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*. 2010, v. 10, s. 123-133. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x.
- CIANI, M., COMITINI, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of Microbiology*. 2011, v. 61, s. 25-32. doi: 10.1007/s13213-010-0069-5.
- CLEMENTE-JIMENEZ, J.M., MINGORANCE-CARZOLA, L., MARTINEZ-RODRIGUEZ, S., LAS HERAS-VAZQUEZ, F.J., RODRIGUEZ-VICO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*. 2004, v. 21, s. 149–155. doi:10.1016/S0740-0020(03)00063-7.
- COCOLIN, L., BISSON, L.F., MILLS, D.A. Direct profiling of the dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, v. 189, s. 81 – 87. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09210.x
- COCOLIN, L., ALESSANDRIA V., DOLCI, P., GORRA R., RANTSIOU K. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, v. 167, s. 29-43.

- COMBINA, M., ELIA, A., MERCADO, L., CATANIA, C., GANGA, A., MARTINEZ, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Microbiology*. 2005, v. 99, s. 237-243. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.017.
- COMITINI, F., GOBBI, M., DOMIZIO, P., ROMANI, C., LENCIONI, L., MANNAZZU, I., CIANI, M. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. 2011, v. 28, s. 873-882. doi:10.1016/j.fm.2010.12.001.
- COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D. *Dairy products: In Molecular techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Editor Cocolin, L.; Ercolini, D. Springer, New York, 2008, p. 31-90.
- CORBO, M.R., LANCIOTTI, R., ALBENZIO, M., SINIGAGLIA, M. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, v. 69, s. 147-152.
- CORSETTI, A., ROSSI, J., GOBBETTI, M. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, v. 69, s. 1 – 10.
- CZÁRÁN, T.L., HOEKSTRA, R.F. Killer-sensitive coexistence in metapopulations of micro-organisms. *Proceeding of Royal Society London Biological Sciences*. 2003, v. 270, s. 1373-1378. doi: 10.1098/rspb.2003.2338.
- CZERUCKA, D., PICHE, T., RAMPAL, P. Review article: Yeast as probiotics – *S. boulardii*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2007, v. 26, s. 767–778. Doi:10.111/j.1365-2036.2007.03442.x.
- ČADEŽ, N., POOT, G.A., RASPOR, P., SMITH, M.T. *Hanseniaspora meyeri* sp nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp nov., *Hanseniaspora lachancei* sp nov and *Hanseniaspora opuntiae* sp nov., novel apiculate yeast species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003, v. 53, s. 1671-1680. Doi: 10.1099/ijfs.
- ČADEŽ, N., RASPOR, P., DE COCK, A.W.A.M., BOEKHOUT, T., SMITH, M.T. Molecular identification and genetics diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Research*. 2002, v. 1, s. 279 – 289. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00046.x
- DANIEL, H.M., MAYER, W. Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 86, s. 61 – 78. doi:10.1016/S0168-1605(03)00248-4.
- DA SILVA-FILHO, E.A., BRITO DOS SANTOS, S.K., RESENDE ADE, M., DE MORAIS, J.O., DE MORAIS, M.A. JR, ARDAILLON SIMOES, D. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005, V. 88, S. 13-23. DOI: 10.1007/S10482-004-7283-8.
- DEÁK, Tibor. *Handbook of food spoilage yeasts*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008, 325 s. ISBN 14-200-4493-1.
- DEÁK, T., PÉTER, G. Developments in yeast taxonomy. *Acta Alimentaria*. 2013, V. 42, S. 55-68. DOI: 10.1556/AALIM.42.2013.1.6.
- DEÁK, Tibor a Larry R BEUCHAT. *Handbook of food spoilage yeasts*. Boca Raton: CRC Press, c1996. ISBN 08-493-2703-2.
- DE BARROS LOPES, M., RAINERI, S., HENSCHKE, P., LANGRIDGE, P. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999, v. 49, s. 915–924.
- DELAVENNE, E., MOUNIER, J., ASMANI, K., JANY, J.L., BARIER, G., LE BLAY, G. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, v. 151, s. 247-251. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.029.
- DELCROIX, A., GUNATA, Z., SAPIS, J., SALMON, J., BAYONOVE, C. Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: Effect on the terpenol content of Muscat wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1994, v. 45, s. 291-296.
- DE MELO PEREIRA, G.V., RAMOS, C.L., GALVAO, C., SOUZA DIAS, E., SCHWAN, R.F. Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. *Letters in Applied Microbiology*. 2010, v. 51, s. 131-137.

- DENDIS, M., HORVATH, R., MICHALEK, J., RUZICKA, F., GRIJALVA, M., BARTOS, M., BENEDIK, J. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003, v. 9, s. 191 – 202. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2003.00719.x.
- DEVOYOD, J.J. Yeasts in cheese-making. In: *Yeast technology*. Editor SPENCER, J.F.T; Berlin: Springer-Verlag, 1989, s. 228-240. ISBN 3540506896.
- DIAS, L., DIAS, S., SANCHO, T., STENDER, H., QUEROL, A., MALFEITO-FERREIRA, M., LOUREIRO, V. Identification of Yeasts originated from related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*. 2003, v. 20, s. 567- 574. doi:10.1016/S0740-0020(02)00152-1.
- DI MAIO, S., POLIZZOTTO, G., DI GANGI, E., FORESTA, G., GENNA, G., VERZERA, A., SCACCO, A., AMORE, G., OLIVA, D. Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* population from old wineries of south-eastern Sicily (Italy): preservation and economic potential. *PLoS One*. 2012, v. 7, s. e30428.
- DOS SANTOS, S.K.B., BASÍLIO, A.C.M., BRASILEIRO, B.T.R.V., SIMOES, D.A., SILVA-FILHO, E.A., MARAIS, M. Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCR-fingerprinting. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007, v. 23, s. 1613 – 1620. Doi: 10.1007/s11274-007-9407-6.
- DUBOURDIEU, D., FREZIER, V. Application of pulsed-field electrophoresis to a study of yeast ecology in spontaneous fermentation. *Revue Francaise d'Oenologie*. 1990. Vol. 30, pp. 37 – 40.
- DUNN, B., SHERLOCK, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research*. 2008, v. 18, s. 1610-1623. doi: 10.1101/gr.076075.108.
- DU TOIT, M., PRETORIUS, I.S. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal: a review. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. 2000, v. 21, s. 74 – 96.
- EJTAHED, H.S., MOHTADI-NIA, J., HOMAYOUNI-RAD, A. *et al.* Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Dairy Science*. 2011, v. 94, s. 3288-3294. doi: 10.3168/jds.2010-4128.
- ELISKASES-LECHNER, F., GINZINGER, W. The yeast flora of surface-ripened cheeses. *Milchwiss*, 1995. Vol. 50, pp. 458-462.
- ERGON, M.C., GULAY, Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. *Mycoses*. 2005, v. 48, s. 126 – 131. Doi: 10.1111/j.1439-0507.2004.01086.x.
- ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, v. 56, s. 297 – 314. Doi:10.1016/j.mimet.2003.11.006.
- ERTEN, H., TANGULER, H. Influence of *Williopsis saturnus* Yeasts in combination with *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Letters in Applied Microbiology*. 2010, v. 50, s. 474 – 479. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2010.02822.x.
- ESTEVE-ZARZOSO, B., BELLOCH, 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, v. 49, s. 329-337. Doi: 10.1099/00207713-49-1-329.
- FADDA, M.E., MOSSA, V., PISANO, M.B., DEPLANO, M., COSENTINO, S. Occurrence and characterization of Yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, v. 95, s. 51 – 59. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001.
- FAHRASMANE, GANOU-PARFAIT. Microbial flora of rum fermentation media. *Journal of Applied Microbiology*, 1998. V. 84, s. 921 – 928. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.00380.x.
- FATICHENTI, F., BERGERE, I.L., DEIANA, P., FARRIS, G.A. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. *Journal of Dairy Research*. 1983, v. 50, s. 449-457.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T., MARTORELL, P., DE LLANOS, R., QUEROL, A. *Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages*. In: AMPARO QUEROL, Graham Fleet. Yeasts in food and beverages. 2006. Berlin: Springer. ISBN 978-354-0283-980.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T., LÓPEZ, V., RAMÓN, D., BARTRA, E., QUEROL, A. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, v. 70, s. 1–10.

- FERNÁNDEZ, M. T., ÚBEDA, J. F., BRIONES, A. I. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, v. 59, s. 29–36.
- 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, v. 173, s. 223 – 229. Doi: 10.1111/j.1574-6968.tb13506.x.
- FERREIRA, A.D., VIJJOEN, B.C. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 86, s. 131-140.
- FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*. 2003a, v. 86, s. 11 – 22. doi:10.1016/S0168-1605(03)00245-9.
- FLEET, G.H., PRAKITCHAIWATTANA, C., BEH, A.L., HEARD, G.M. The yeast ecology of wine grapes. Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts. *Research Signpost, Kerala, India*, 2002. s. 1 – 17.
- FLEET, G.H. *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers*. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2001, pp. 747 – 772. ISBN 1-55581-208-2.
- FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*. 2008, v. 8, s. 979-995. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x.
- FLEET, G.H. Wine, Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers, 3rd edn (Doyle, M.P. a Beuchat, L.R. eds.), 2007, s. 863-890. ASM Press, Washington, DC.
- FLEET, G.H., PRAKITCHAIWATTANA, C., BEH, A.L., HEARD, G.M. The yeast ecology of wine grapes. Biodiversity of wine yeasts (Ciani, M., ed), 2002, s. 1-18. Research Signpost, Kerala, India.
- FLEET, G.H. Yeasts in dairy products. A Review. *Journal of Applied Bacteriology*. 1990, v. 68, s. 199-211. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02566.x.
- FLEET, G.H. Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1992, v. 12, s. 1 – 44.
- FLEET, G.H.: Yeasts in food and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007, v. 18, s. 170 – 175. Doi: 10.1016/j.copbio.2007.01.010.
- FLEET, G.H. The commercial and Community Significance of Yeasts in food and beverage production. In Editor QUEROL, A., FLEET G.H. Yeasts in food and beverages. Berlin: Springer, 2006, s. 1-12. ISBN 9783540283980.
- GALLEGO, F. J., PEREZ, M. A., MARTINEZ, I., HIDALGO, P. Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1998, v. 49, s. 350-351.
- GARDINI, F., TOFALO, R., BELLETTI, N., IUCCI, L., SUZZI, G., TORRIONI, S., GUERZONI, M.E., PANCIOTTI, R. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology*. 2006, v. 23, s. 641-648. doi:10.1016/j.fm.2005.12.005.
- GOGNIES, S., BARKA, E.A., GANVORS-CLAISSE, A., BELARBI, A. Interactions between yeasts and grapevines: Filamentous growth, endopolygalacturonase and phytopathogenicity of colonizing yeasts. *Microbial Ecology*. 2006, v.51, s. 109-116. Doi:10.1007/s00248-005-0098-y.
- GOLIĆ, N., ČADEŽ, N., TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A., ŠURANSKÁ, H., BEGANOVIĆ, J., LOZO, J., ŠUŠKOVIĆ, J., RASPOR, P., TOPISIROVIĆ, L. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain region soft Serbia and lowland region of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, v. 166, s. 294-300. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032.
- GONZÁLEZ, R., MUNOZ, R., CARRASCOSA, A.V. *Production of Wine starter Cultures*. In Molecular Wine Microbiology. Editor CARRASCOSA, A., MUNOZ, R., GONZÁLEZ, R. Elsevier, 2012. 363 s. (str. 279-302). ISBN: 978-0-12-375021-1.
- GORI, K., HEBRAUD, M., CHAMBON, C., MORTENSEN, H.D., ARNEBORG, N., JESPERSEN, L. Proteomic changes in *Debaryomyces hansenii* upon exposure to NaCl stress. *FEMS Yeast Research*. 2007, v. 7, s. 293-303. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2006.00155.x.
- GORI, K., JESPERSEN, L. The language of cheese-ripening cultures. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2010, v. 65, s. 192-194.

- GORI, K., SORENSEN, L.M., PETERSEN, M.A., JESPERSEN, L., ARNEBORG, N. *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavour compounds in a cheese-surface model. *Microbiologyopen*. 2012, v. 2, s. 161-168. doi: 10.1002/mbo.3.11.
- GORI, K, MORTENSEN, H.D., ARNEBORG, N., JESPERSEN, L. Expression of the GPD1 a GPD2 orthologues and glycerol retention during growth at high NaCl concentrations. *Yeast*. 2005, v. 22, s. 1213-1222. DOI: 10.1002/yea.1306.
- GRANCHI, L., BOSCO, M., MESSINI, A., VINCENZI, 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, v. 87, s. 949-956. Doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00600.x.
- GREUTER, W., BARRIE, F.R., BURDET, H.M., CHALONER, W.G., DEMOULIN, V., HAWKSWORTH, D.L., JORGENSON, P.M., NICHOLSON, D.H., SILVA, P.C., TREHANE, P., MCNEIL, J. (eds). *International Code for Botanical Nomenclature*. 1994. Koeltz Scientific Books, Konigstein.
- GUILLAMÓN J.M., SABATE, J., BARDKO, E., CANO, J., QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*. 1998, v. 169, s. 387 – 392. Doi: 10.1007/s002030050587.
- GUILLAMÓN, J. M., BARRIO, E., QUEROL, A. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers. Relationships between genetic distance and geographic origin. *Systematic and Applied Microbiology*, 1996. v. 19, s. 122–132.
- GULBINIENE, G., KONDRATINE, L., JOKANTAITE, T., SERVICE, E., MELVYDAS, V., PETKUNIENE, G. Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Technology and Biotechnology*. 2004, v. 42, s. 159-163.
- HEARD, G.M. Novel yeasts in winemaking-looking to the future. *Food Australia*. 1999, v. 51, s. 347–352.
- HENSCHKE, P. Wine yeast. In: Zimmerman, F.K.; Entian, K.D.: *Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*. Technomic Publishing, Lancaster, UK. 1997, p. 567. ISBN-10: 1566764661.
- HERAS-VAZQUEZ, F., 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 two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research*. 2003, v. 3, s. 3 – 9. doi: 10.1111/j.1567-1364.2003.tb00132.x.
- HOCKING, A.D., PITT, J.I., SAMSON, R.A., UHRANE, U. *Advances in food mycology*. Springer, New York. 2006. s. 371. e-ISBN 0-387-28391-9.
- HONG, Y.A., PARK, H.D. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: Potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. *Food Microbiology*. 2013, v. 34, s. 207-214. doi: 10.1016/j.fm.2012.12.011.
- HUANG, CH-H., LEE, F-L., TAI, CH-J.: A novel specific DNA marker in *Saccharomyces bayanus* for species identification of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Microbiological Methods*, 2008. Vol. 75, pp. 531 – 534. Doi: 10.1016/j.mimet.2008.08.005.
- HUI, Y.H., MEUNIER-GODDIK, L., HANSEN, A.S., JOSEPHSEN, J., NIP, W-K., STANDFIELD, P.S., TOLDRÁ, F. *Handbook of food and beverage fermentation technology*. New York: Marcel Dekker, 2004. ISBN 02-039-1355-8.
- CHANG, H.W., DOM, Y.D., SUNG, Y., KIM, K.H., ROH, S.W., YOON, J.H., AN, K.G., BAE, J.W. Quantitative real time PCR assays for the enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* and the *Saccharomyces sensu stricto* complex in human feces. *Journal of Microbiological Methods*. 2007, v. 71, s. 191 – 201. doi:10.1016/j.mimet.2007.08.013.
- CHANPRASARTSUK, O-O., PRAKITCHAIWATTANA, CH., SANGUANDEEKUL, R., FLEET, G.H. Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments: and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, v. 101, s. 7500-7509. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.047.
- CHATONNET, P., DUBOURDIEU, D., BOIDRON, J.N., PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1992, v. 60, s 165–178.

- IBEAS, J. I., LOZANO, I., PERDIGONES, F., JIMENEZ, J.: Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, v. 62, s. 998–1003.
- IRLINGER, F., MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, v. 20, s. 142-148. Doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016.
- JACKSON, R.S.: *Wine science – principles and applications*. 3rd edition. Academic Press Elsevier, San Diego. 2008. ISBN 978-0-12-373646-8.
- JACOBSEN, M., NARVHUS, J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*. 1996, v. 6, s. 755-768.
- JACQUES, N., CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, v. 126, s. 321-326. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.020
- JAMES, S.A., CAI, J., ROBERTS, I.N., COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997, v. 47, s. 453–460.
- JANDEROVÁ, B., BENDO VÁ, O.: Úvod do biologie kvasinek. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. 108 s. ISBN 80-7184-990-1.
- JANY, J-L., BARBIER, G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*. 2008, v. 25, s. 839 – 848. Doi: 10.1016/j.fm.2008.06.003.
- 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, v. 23, s. 709 – 716. doi: 10.1016/j.fm.2006.02.007.
- JOLLY, N.P.; AUGUSTYN, O.P.H.; PRETORIUS, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2006, v. 27, s. 15-39.
- JOLLY, N.P., AUGUSTYN, O.P.H., PRETORIUS, I.S. The occurrence of non-*Saccharomyces* yeast strains over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. 2003a, v. 24, s. 35 – 42.
- JOLLY, N.P., AUGUSTYN, O.P.H., PRETORIUS, I.S. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. 2003b, v. 24, s. 63 – 69.
- KARAOLIS, C., BOTSARIS, G., PANTELIDES, I., TSALTAS, D. Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic goat's yoghurt: survival and organoleptic effects. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013, v. 48, s. 1445-1452. doi: 10.1111/ijfs.12111.
- KASSEMAYER, H-H., BERKELMANN-LOHNERTZ: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2009. s. 522. ISBN 978-3-540-85462-3.
- KRÁLOVÁ, B., FUKAL, L., RAUCH, P., RUMML, T.: *Bioanalytické metody*. Praha, 2001. s. 254. ISBN 80-7080-449-1.
- KUNKEE, R., BISSON, L., 1993. Winemaking yeasts, In: *Yeasts*. 2nd ed. Edited by A.H. ROSE AND J.S.HARRISON. London: Academic Press, 1993, s. 69-127. ISBN 0125964153
- KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J. Phylogenetic relationships among yeasts of the *Saccharomyces* complex determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeasts Research*. 2003b, v. 3, s. 417 – 432. Doi: 10.1016/S1567-1356(03)00012-6.
- KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J. Phylogenetic relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces*, determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeasts*. 1991, v. 7, s. 61 - 72. Doi: 10.1002/yea.320070107.
- KURTZMAN, C. P., FELL, J. W., BOEKHOUT. *Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts*. In: *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Editor C. KURTZMAN, J. W. FELL, T. BOEKHOUT. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011, xxii, 289, 48, s. 87-110 ISBN 978-012-3847-089.
- KURTZMAN, C.P.; PHAFF, H.J.; MEYER, S.A.: Nucleic Acid Relatedness Among Yeasts. In *Yeast Genetics Fundamental and Applied Aspects*. Editor J.F.T. SPENCER, J.F.T.DOROTHY M. New York, NY: Springer New York, 1983, s. 140-166. ISBN 9781461254911.

- KURTZMAN, C. P., BOEKHOUT, T., ROBERT, V., FELL, J. W., DEÁK, T. Methods to identify yeasts. In *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2003a, s. 69-121. ISBN 1-85573-706-x.
- KURTZMAN, C.P. Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience*. 2006, v. 47, s. 65-71. Doi: 10.1007/s10267-006-0280-1.
- KURTZMAN, C. P., FELL, J. W., BOEKHOUT, T., ROBERT, V., 2011: *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Editor KURTZMAN, C.; FELL J.W, BOEKHOUT, T. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011, 178 s. ISBN 978-012-3847-089.
- KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. The yeasts, a taxonomic study (4th ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998. ISBN 0 44 81312 8.
- KURTZMAN, C. P., FELL, J. W. Yeast systematics and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Editor C. ROSA, G. PÉTER, Berlin: Springer, 2006, s. 11-30. ISBN 9783540309857.
- KURTZMAN, C.P., ROBBETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998, v. 73, s. 331–371.
- KWAST, K.E., LAI, L.C., MENDA, N. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of *Rox1* and other factors in mediating the anoxic response. *Journal of Bacteriology*. 2002, v. 184, s. 250 – 265.
- LAMBRECHTS, M.G., PRETORIUS, I.S. Yeast and its importance to wine aroma – a review. *South African Journal of Enology Viticulture*. 2000, v. 21, s. 97-129.
- LAVALLÉE, F., SALVAS, Y., LAMY, S., THOMAS, D.Y., DEGREGRE, R., DULAN, L. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the productions of wine yeast strains. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1994, v. 45, s. 86–91.
- LAVOIE, K., TOUCHETTE, M., ST-GELAIS, D., LABRIE, S. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of province of Quebec. *Dairy Science and Technology*. 2012, v. 92, s. 455-468. Doi: 10.1007/s13594-011-0051-4.
- LEE, P.R., ONG, Y.L., CURRAN, P., LIU, S.Q. Profile of volatile compounds during papaya juice fermentation by a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *Food Microbiology*. 2010, v. 27, s. 853 – 861. doi:10.1016/j.fm.2010.05.010.
- LEGRAS, J., KARST, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, v. 221, s. 249–255. Doi: 10.1016/S0378-1097(03)00205-2.
- LE JEUNE, CH., ERNY, C., DEMUYTER, C. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*. 2006, v. 23, s. 709-716. doi: 10.1016/j.fm.2006.02.007.
- LI, S.S., CHENG, CH., LI, Z., CHEN, J.Y., YAN, B., HAN, B.Z., REEVES, M. Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, v. 138, s. 85-90. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.009.
- LITI, G., CARTER, D.M., MOSES, A.M., WARRINGER, J., PARTS, L. *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*. 2009, v. 458, s. 337-341. doi:10.1038/nature07743.
- LITI, G., BARTON, D.B.H, LOUIS, E.J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*. 2006, v. 174, s. 839-850. doi: 10.1534/genetics.106.062166.
- LLANOS-FRUTOS, R., FERNANDEZ-ESPINAR, M.T., QUEROL, A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leewenhoek*. 2004, v. 85, s. 175-185. Doi: 10.1023/B:ANTO.0000020154.56649.0f.
- LODDER, J. *The Yeasts. A Taxonomic Study*, 2nd ed. 1970. North Holland Publ. Co., Amsterdam.
- LONGO, E., CANSADO, J., AGRELO, D., VILLA, T.G. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *American Journal of Enology Viticulture*. 1991, v. 42, s. 141 – 144.

- LOPANDIC, K., ZELGER, S., BANSZKY, L.K., ELISKASES-LECHNER, F., PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*. 2006, v. 23, s. 341-350. doi:10.1016/j.fm.2005.05.001.
- LÓPEZ, V., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T., BARRIO, E., RAMÓN, D., QUEROL, A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 81, s. 63–71.
- LOUREIRO, V., QUEROL, A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science and Technology*. 1999, v. 10, s. 356 – 365.
- LOUREIRO, V., MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. Review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 86, s. 23-50. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00246-0.
- MAKINO, H., FUJIMOTO, J., WATANABE, K. Development and evaluation of a real-time quantitative PCR assay for detection and enumeration of yeasts of public health interest in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, v. 140, s. 76-83. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.004.
- MANZANO, M., COCOLIN, L., IACUMIN, L., CANTONI, C., COMI, G. PCR-TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, v. 101, s. 333–339. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.049.
- MAQUEDA, M., ZAMORA, E., RODRIGUEZ-COUSINO, N., RAMINEZ, M. Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiology*. 2010, v. 27, s. 205-209. Doi: 10.1016/j.fm.2009.10.004.
- MARTINI, A., VAUGHAN-MARTINI, A. *Grape must fermentation: past and present*. In: Yeast Technology. Editor G. REED, W. W. TILAK. *Yeast Technology*. Second Edition. Dordrecht: Springer Netherlands, 1990, s. 105-123. ISBN 9789401197731.
- MARTELL, P., MALFEITO-FERREIRA, M., FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., LOUREIRO, V., QUEROL, A. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, v. 106, s. 79 – 84. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.014.
- MENDOZA, L.M., DE NADRA, M.C.M., FARIAS, M.E. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnology Letters*. 2007, v. 29, s. 1057-1063. doi: 10.1007/s10529-007-9355-0.
- MERCADO, L., JUBANY, S., GAGGERO, C., MASUELLI, R.W., COMBINA, M. MOlecular relationships between *Saccharomyces cerevisiae* strains involved in winemaking from mendoza, argentina. *Current Microbiology*. 2010, v. 61, s. 506-514. doi: 10.1007/s00284-010-9645-y.
- MILLS, D.A., JOHANNSEN, E.A., AND COCOLIN, L. Yeast Diversity and Persistence in Botrytis-affected Wine Fermentations. *Applied Environmental Microbiology*. 2002, v. 68, s. 4884–4893. doi: 10.1128/AEM.68.10.4884-4893.2002.
- MOLINA, F.I., JONG, S.C., HUFFMAN, J.L. Restriction polymorphisms in the internal transcribed spacers and 5,8S rDNA of *Saccharomyces*. *Current Microbiology*. 1992, v. 25, s. 251-255.
- MOLINA, F.I., JONG, S.C., HUFFMAN, J.L. PCR amplification of the 3´external transcribed and intergenic spacers of the ribosomal DNA repeat unit in three species of *Saccharomyces*. *FEMS Microbiology Letters*. 1993, v. 108, s. 259-264.
- MOLNAR, O., MESSNER, R., PRILLINGER, H., STAHL, U., SLAVIKOVA, E. Genotypic identification of *Saccharomyces* species using RAPD DNA analysis. *Systematic and Applied Microbiology*. 1995, v. 18, s. 136 – 145.
- MUIR, A., HARRISON, E., WHEALS, A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Research*. 2011, v. 11, s. 552-563. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00745.x
- NAKAO, Y., KANAMORI, T., ITOH, T., KODAMA, Y., RAINIERI, S., NAKAMURA, N., DHIMONAGA, T., HATTORI, M., ASHIKARI, T. Genome sequence of the larger brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research*. 2009, v. 16, s. 115-129. doi: 10.1093/dnares/dsp003.

- NAUMOV, G.I., JAMES, S.A., NAUMOVA, E.S., LOIS, E.J., ROBERTS, I.N. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mitakae*. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*. 2000, v. 50, s. 1931 – 1942.
- NAUMOV, G., NAUMOVA, E.S., MASNEUF-POMAREDE, I.: Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai. *Anthonie Van Leeuwenhoek*. 2010, v. 98, s. 1-7. doi: 10.1007/s10482-010-9441-5.
- NAUMOVA, E.S., NAUMOV, G.I., MASNEUF-POMAREDE, I., AIGLE, M., DUBOURDIEU, D. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast*. 2005, v. 22, s. 1099-1115. doi: 10.1002/yea.1298.
- NDOYE B., ANDRIAMAHERY R.E., LAPOINTE G., ROY D. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science and Technology*. 2011, v. 91, s. 495-524. Doi: 10.1007/s13594-011-0031-8.
- NESS, F., LAVALLE, F., DUBOURDIEU, D., AIGLE, M., DULAU, L. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of Science Food and Agriculture*. 1993, v. 62, s. 89–94. Doi: 10.1002/jsfa.2740620113.
- NIKOLAOU, E., SOUFLEROS, E.H., BOULOUMPASI, E., TZANETAKIS, N. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*. 2006, v. 23, s. 205-211. doi:10.1016/j.fm.2005.03.004.
- NISIOTOU, A.A., SPIROPOULOS, A.E., NYCHAS, G-J. E. Yeast community structure and dynamics in healthy and Botrytis-Affected grape must fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, v. 73, s. 6705 – 6713. doi: 10.1128/AEM.01279-07.
- O'DONNELL, K. *Fusarium and its near relatives*. In: The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Editor. REYNOLDS DR, TAYLOR JW WALLINGFORD: CAB International. s. 225-233, 978-0851988658.
- ORBERA, R.: Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2004. V. 21. s. 15 – 19.
- ORTIZ, M.J., BARRAJÓN, N., BAFFI, M.A., ARÉVALO-VILLENA, M., BRIONES, A. Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT – Food Science and Technology*. 2013, v. 50, s. 371-377.
- PEREIRA-DIAS, S., POTES, M.E., MARINHO, A., MALFEITO-FEREIRA, M., LOUREIRO, V. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, v. 60, s. 55 – 63.
- PEREZ-ORTIN, J. E., GARCIA-MARTINEZ, J., ALBEROLA, T. M. DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *Journal of Biotechnology*. 2002, v.98, s.227–241.
- PINA, C., SANTOS, C., COUTO, J.A., HOGG, T. Ethanol tolerance of five *non-Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. *Food Microbiology*. 2004, v. 21, s. 439-447. Doi: 10.1016/j.fm.2003.10.009.
- PIŠKUR, J., LING, Z., MARCET-HOUBEN, M., ISHCHUK, O.P., AERTS, A., LABUTTI, K., COPELAND, A., LINDQUIST, E., BARRY, K., COMPAGNO, C., BISSON, L., GRIGORIEV, I.V., GABALDÓN, T., PHISTER, T. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *International Journal of Food Microbiology*, 2012. V. 157, s. 202 – 209. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.008.
- PITT, J.I., HOCKING, A.D. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. New York: Springer, c2009. ISBN 03-879-2206-7.
- PIZZARO, F., VARGAS, F., AGOSIN, E. A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast*. 2007, v. 24, s. 977-991. Doi: 10.1002/yea.1545.
- PRAKITCHAIWATTANA, CH.J., FLEET, G.H., HEARD, G. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*. 2004, v. 4, s. 865 – 877. DOI: 10.1016/j.femsyr.2004.05.004.

- PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 2000, v. 16, s. 675-729. DOI: 10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B.
- PRILLINGER, H., MOLNÁR, O., ELISKASES-LECHNER, F., LOPANDIC, K. Phenotypic and genotypic identification of Yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999, v. 75, s. 267 – 283.
- PRILLINGER H., MOLNÁR, O., ELISKASES-LECHNER F., LOPANDIC, K. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999, v. 75, s. 267-283.
- QUEROL, A., Fleet, G., *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer, 2006. ISBN 978-354-0283-980.
- QUEROL, A., BARRIO, E., AND RAMÓN, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*. 1992, v. 15, s.439–446.
- QUEROL, A., BARRIO, E. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*. 1990, v. 18, 1657 s.
- QUEROL, A., FLEET, G.H.: *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, Německo, 2006. s. 453. ISBN 3-540-28388-9.
- QUEROL, A., BOND, U. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiology Letters*. 2009, v. 293, s. 1-10. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01480.x
- QUESADA, M. P., CENIS, J. L. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR in the characterization of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1995, v. 46, s. 204–208.
- QUIGLEY, L., O’SULLIVAN, O., BERESFORD, T.P., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F., COTTER, P.D. Molecular approaches to analysing the microbial composition of war milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, v. 150, s. 81-94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001.
- RACHIDI, N., BARRE, P., BLONDIN, B. Examination of the transcriptional specificity of an enological yeast. A pilot experiment on the chromosome III right arm. *Current Genetics*. 2000, v. 37, s. 1-11. Doi: 10.1007/s002940050001.
- RANIERI, S., PRETORIUS, I.S. Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*. 2000, v. 50, s. 15-31.
- RAINERI, S., ZAMBONELLI, C., KANEKO, Y. *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2003, v. 96, s. 1 – 9.
- RAINIERI, S., KODAMA, Y., KANEKO, Y., MIKATA, K., NAKAO, Y., ASHIKARI, T. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the larger brewing strain genome. *Applied Environmental Microbiology*. 2006, v. 72, s. 3968-3974. doi: 10.1128/AEM.02769-05.
- RASPOR, P., MIKLIČ MILEK, D., POLANC, J., SMOLE MOŽINA, 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, v. 109, s. 97 – 102. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.017.
- REDZEPOVIC, S., ORLIC, S., MAJDAK, A., KOZINA, B., VOLSCHENK, H., VIJLOEN-BLOOM, M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, s. 83, s. 49-61. Doi: 10.1016/S0168-1605(02)00320-3.
- REMENTERIA, A., RODRIGUEZ, J.A., CADAVAL, A., AMENABAR, R., MUGURUZA, J.R., HERNANDO, F.L., SEVILLA, M.J. Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the „Txakoli de Bizkaia“ region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 86, s. 201 – 207. doi:10.1016/S0168-1605(03)00289-7.
- RENAULT, P., MIOT-SERTIER, C., MARULLO, P., HERNÁNDEZ-ORTE, P., LAGARRIGUE, L., LONVAUD-FUNEL, A. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: potential applications in wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, v. 134, s. 201 – 210. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.06.008.
- RENDZEPOVIC, S., ORLIC, S., MAJDAK, A., KOZINA, B., VOLSCHENK, H., VIJLOEN-BLOOM, M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 83, s. 49-61. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00320-3.

- RENOUF, V., CLAISSE, O., LONVAUD-FUNEL, A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, v. 75, s. 149 – 164. doi: 10.1007/s00253-006-0798-3.
- RENOUF, V., LONVAUD-FUNEL, A. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiology Research*. 2007, v. 162, s. 154 – 167. doi: 10.1016/j.micres.2006.02.006.
- RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEN, D., DONÉCHE, B., LONVAUD, A. *Handbook of Enology. Vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinification*. 2nd ed. Wiley, 2008. 497 s. ISBN 0-471-97362-9.
- ROJAS, V., GIL, J., PINAGA, F., MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 86, s. 181 – 188. doi:10.1016/S0168-1605(03)00255-1.
- ROMANO, P., FIORE, C., PARAGGIO, M., CARUSO, M., CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 86, s. 169–180. doi:10.1016/S0168-1605(03)00290-3.
- ROOSTITA, R., FLEET, G.H. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, v. 28, s. 393-404.
- ROOSTITA, R., FLEET, G.H. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, v. 31, s. 205-219.
- ROSSIGNOL, T., DULAU, L., JULIN, A., BLONDIN, B. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*. 2003, v. 20, s. 1369-1385. Doi: 10.1002/yea.1046.
- SABATÉ, J.; GUILLAMON, J. M.; CANO, J. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, v. 193, s. 255-259, 2000. Doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09433.x.
- SALMON, J., BARRE, P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by depression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied Environmental Microbiology*. 1998, v. 64, s. 3831 – 3837.
- SAMPAIO, J.P., GONCALVES, P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied Environmental Microbiology*. 2008, v. 74, s. 2144-2152. doi: 10.1128/AEM.02396-07.
- SCANNELL, D.R., ZILL, O.A., ROKAS, A., PAYEN, C., DUNHAM, M.J.M EISEN, M.B., RINE, J., JOHNSTON, M., HITTINGER, C.T. The awesome power of yeast evolutionary genetics: new genome sequences and strain resources for the *Saccharomyces sensu stricto* genus. *G3 Genes, Genomes, Genetics*. 2011, v. 1, s. 1-25. doi: 10.1534/g3.111.000273.
- SEE-ERA-NET Plus Project ERA-195/01 (PSALAB) „Conservation and standardisation of traditional technologies of fermented milk products based on autochthonous microbiota“
- SEILER, H., BUSSE, M. The yeasts of cheese fines. *International Journal of Food Microbiology*. 1990, v. 11, s. 289-303.
- SCHENA, L., NIGRO, F., PENTIMONE, I., LIGORIO, A., IPPOLITO, A. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*. 2003, v. 30, s. 209 – 220. Doi: 10.1016/S0925-5214(03)00111-X.
- SCHULLER, D., VALERO, E., DEQUIN, S., CASAL, M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, v. 231, s. 19–26. Doi: 10.1016/S0378-1097(03)00928-5.
- SCHULLER, D., ALVES, H., DEQUIN, S., CASAL, M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*. 2005, v. 51, s. 167–177. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.08.003.
- SMOLE-MOŽINA, S., DLAUCHY, D., DEÁK, T., RASPOR, P. Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulasporea* yeast by PCR ribotyping. *Letters in Applied Microbiology*. 1997, v. 24, s. 311–315. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1997.00068.x.
- SNIEGOWSKI, P.D., DOMBROWSKI, P.G., FINGERMAN, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of

- reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeasts Research*. 2002, v. 1, s. 299-306. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00048.x
- SOARES, E.V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2010, v. 110, s. 1-18. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x.
- SODEN, A., FRANCIS, I.L., OAKEY, H., HENSCHKE, P.A. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2000, v. 6, s. 21 – 30. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x.
- SPENCER, J.F.T., SPENCER, D.M. *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Springer. Německo. 1997. s. 381. ISBN 3-540-56820-4.
- SPONHOLZ, W.R. *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland 1993, s. 510. ISBN 978-0415278508.
- STENDER, H., KURTZMAN, C., HYLDIG-NIELSEN, J. J., SØRENSEN, D., BROOMER, A., OLIVEIRA, K., PERRY-O'KEEFE, H., SAGE, A., YOUNG, B., AND COULL, J. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied Environmental Microbiology*. 2001, v. 67, s. 938–941. Doi: 10.1128/AEM.67.2.938-941.2001.
- STRAUSS, M.L.A., JOLLY, N.P., LAMBRECHTS, M.G., VAN RENSBERG, P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by *non-Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, v. 91, s. 182-190. Doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x.
- STYGER, G., PRIOR, B., BAUER, F.F. Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, v. 38, s. 1145-1159. Doi: 10.1007/s10295-011-1018-4.
- SUÁREZ-LEPE, J.A., MORATA, A. New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*. 2012, v. 23, s. 39-50. Doi:10.1016/j.tifs.2011.08.005.
- SUGITA, T. *Trichosporon* Nehrend (1980), In: The yeasts, a taxonomic study, 5th ed. Editor Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boeckhout, T. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011, s. 2015-2061. ISBN 9780123847089.
- SUZUKI, M., NAKASE, T. A phylogenetic study of ubiquinone-7 species of the genus *Candida* based on 18S ribosomal DNA sequence divergence. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2002, v. 48, s. 55–65.
- SUZZI, G., SCHIRINE, M., MARTUSCELLI, M., GATTI, M., FORNASARI, M.E., NEVIANI, E. Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Research*. 2003, v. 3, s. 159-166. Doi: 10.1016/S1567-1356(02)00183-6.
- SWIEGERS, J.H., BARTOWSKY, E.J., HENSCHKE, P.A., PRETORIUS, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2005, v. 11, s. 139-173. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x.
- ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J.: *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita. Brno, 2008. 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- 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.
- TAMAG, J.P., FLEET, G. *Yeasts Diversity in Fermented Foods and Beverages*. In *Yeasts Biotechnology: Diversity and Applications*. Editor SATYANARAYANA, T., KUNZE, G. Dordrecht: Springer, 2009. ISBN 9781402082924.
- THOMAS, S.D. *The yeast. Yeast Technology*. Academic Press Ltd., London, United Kingdom 1993, s. 620. ISBN 978-0125964159.
- TOFALO, R., CHAVES-LÓPEZ, C., DI FABIO, F., SCHIRONE, M., FELIS, E.G., TORRIANI, S., PAPARELLA, A., SUZZI, G. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, v. 130, s. 179-187. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.024.
- TORIJA, M.J., ROZÉS, N., POBLET, M., GUILLAMON, J.M., MAS, A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001, v. 79, s. 345 – 352. doi: 10.1023/A:1012027718701.

- TORNAI-LEHOCZKI, J., DLAUCHY, J. An opportunity to distinguish species of *Saccharomyces sensu stricto* by electrophoretic separation of the large chromosomes. *Letters in Applied Microbiology*. 1996, v. 23, s. 227 – 230. Doi: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb00071.x.
- TRISTEZZA, M., VETRANO, C., BLEVE, G., GRIECO, F., TUFARIELLO, M., QUARTA, A., MITA, G., SPANO, G., GRIECO, F. Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2012, v. 39, s. 81-92. Doi:10.1007/s10295-011-1002-z.
- TUDOR, E.A., BOARD, R.G. *Food-spoilage yeasts*. In: The yeasts, vol 5. Yeast technology, 2nd. Editor ROSE, A.H., HARRISON, J.S. London: Academic P, 1993, s. 435-516. ISBN 9780125964159.
- VADKERTIOVÁ R., SLÁVIKOVÁ E. Killer activity of yeasts isolated from the water environment. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995, v. 41, s. 759-766.
- VAN DER AA KÜHLE, A., SKOVGAARD, K., JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* and foodborne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, v. 101. s. 29-40. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.039.
- VAN DEN TEMPEL, T., JACOBSEN, M. *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* as potential starter cultures for production of blue cheeses. *International Dairy Journal*. 2000, v. 10, s. 263-270.
- VAN DER VOSSEN, J.M.B.M., RAHAOUI, H., DE NIJS, M.W.C., HARTOG, B.J. PCR methods for tracing and detection of yeasts in the food chain. *Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects*, 2003. s. 123 – 138.
- VALENTE, P., RAMOS, J.P., LEONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Canadian Journal of Microbiology*. 1999, v. 45, s. 949 – 958.
- VALENTE, P., GOUVEIA, F. C., LEMOS, G. A., PIMENTEL, D., VAN ELSAS, J. D., MENDONCA-HAGLER, L. C., HAGLER, A. N. PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology Letters*. 1996, v. 137, s. 253–256.
- VERSAVAUD, A., COURCOUX, P., ROULLAND, C. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, v. 61, s. 3521 – 3529.
- VEZINHET, F., BLONDIN, B., HALLET, J.N. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as a tool for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990, v. 32, s. 568-571.
- VIANA, F., GIL, J.V., GENOVÉS, S., VALLÉS, S., MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeast for mixed starters based on ester formation and enological traits. *Food Microbiology*. 2008, v. 25, s. 778 – 785. doi:10.1016/j.fm.2008.04.015.
- VILJOEN, B.C., KNOX, A.M., DE JAGER, P.H., LOURENS-HATTING, A. Development of yeast population during processing and ripening of blue veined cheese. *Food Technology and Biotechnology*. 2003, v. 4, s. 291 – 297.
- VOLSCHENK, H., VAN VUUREN, H.J., VILJOEN-BLOOM, M. Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Current Genetics*. 2003, v. 43, s. 379-391. Doi: 10.1007/s00294-003-0411-6.
- ÚBEDA, J.F., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., BRIONES, A.I.: Application of PCR-TTGE and PCR-RFLP for intraspecific and interspecific characterization of the genus *Saccharomyces* using actin gene (ACT1) primers. *Current Microbiology*. 2009, v. 58, s. 58-63. doi: 10.1007/s00284-008-9283-9.
- UGLIANO, M., HENSCHKE, P.A. *Yeast wine and flavor*. In: *Wine chemistry and biochemistry*. Editor MORENO-ARRIBAS, M., POLO, M. New York: Springer, c2009, s. 313-393. ISBN 9780387741185.
- WANG, S.A., BAI, F.Y.: *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008, v. 58, s. 510-514. doi: 10.1099/ijs.0.65331-0.
- WANG, Q.-M., XU, J., WANG, H., LI, J., BAI, F.-Y. *Torulaspora quercuum* sp. nov. and *Candida pseudohumilis* sp. nov., novel yeasts from human and forest habitats. *FEMS Yeasts Research*. 2009, v. 9, s. 1322-1326. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00567.x.

- WALKER, G.M. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 1998, 350 s. ISBN 04-719-6446-8.
- WALKER J.M., RAPLEY. R. *Molecular biomethods handbook*. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. ISBN 9718-160-3273-756.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, (Innis N., D. Gelfand, J. Sninsky, T. White, eds.), 1990, s. 315-322. London: Academic Press.
- XUFRE, A., ALBERGARIA, H., GIRIO, F., SPENSER-MARTINS, I. Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, v. 38, s. 127-132. Doi:10.1007/s10295-010-0837-z.
- YARROW, D. *Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts*. The Yeasts, a Taxonomic Study, Vol. 4. Editor KURTZMAN C.P., FELL J.W.. 1998, s. 77 – 100. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0 44 81312 8.
- ZAGORC, T., MARÁZ, A., ČADEŽ, N., POVHE JEMEC, K., PÉTER, G., RESNIK, M., NEMANIČ, J., RASPOR, P. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiology*. 2001, v. 18, s. 441-451. Doi: 1006/fmic.2001.0422.
- ZHOU, J.Z., LIU, X.L., JIANG, H.H., DONG, M.S. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 2009, v. 26, s. 770-775. Doi: 10.1016/j.fm.2009.04.009.

Dostupné z: http://cdn.intechopen.com/pdfs/34911/InTech-Gel_electrophoresis_based_genetic_fingerprinting_techniques_on_environmental_ecology.pdf [cit. 8.8.2013].

Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/srs/portal/integrovana-ochrana-rostlin/> [cit. 5.9.2013].

Dostupné z: <http://cepacia.wz.cz/burkholderia/molekular.html> [cit. 25.1.2011].

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Rody

A.	<i>Aureobasidium</i> sp.	P.	<i>Pichia</i> sp.
B.	<i>Brettanomyces</i> sp.	R.	<i>Rhodotorula</i> sp.
C.	<i>Candida</i> sp.	Rh.	<i>Rhodospiridium</i> sp.
Cr.	<i>Cryptococcus</i> sp.	S.	<i>Sacchromyces</i> sp.
D.	<i>Debaryomyces</i> sp.	Sp.	<i>Sporidiobolus</i> sp.
Dek.	<i>Dekkera</i> sp.	T.	<i>Torulasporea</i> sp.
G.	<i>Galactomyces</i> sp.	Tr.	<i>Trichosporon</i> sp.
H.	<i>Hanseniaspora</i> sp.	Y.	<i>Yarrowia</i> sp.
Ha.	<i>Hansenula</i> sp.	Z.	<i>Zygosaccharomyces</i> sp.
I.	<i>Issatchenkia</i> sp.	Kaz.	<i>Kazachstania</i> sp.
K.	<i>Kloeckera</i> sp.	L.	<i>Lachancea</i> sp.
Kl.	<i>Kluyveromyces</i> sp.		
M.	<i>Metschnikowia</i> sp.		

Další zkratky

BMK	bakterie mléčného kvašení
G, C	guanin, cytosin
PFGE	pulzní gelová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
rDNA	ribosomální deoxyribonukleová kyselina
ITS	přepisovaný mezerník
ETS	vnější přepisovaný mezerník
IGS	intergenový mezerník
NTS	nepřepisovaný mezerník
LSU	velká ribosomální podjednotka
PCR	polymerázová řetězová reakce
RAPD	amplifikace polymorfni DNA náhodná
AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
rep-PCR	repetitivně polymerázová řetězová reakce
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
TGGE	teplotní gradientová gelová elektroforéza
bp	páry bází
°C	stupně Celsia
M	koncentrační jednotka, mol
qPCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
DHPLC	denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie
dsDNA	dvouřetězová DNA
CFU	z angl. colony forming units; jednotky tvořící kolonie (KTJ)
ssDNA	jednořetězová DNA
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů
mtDNA	mitochondriální DNA
5,8S; 18S; 26S	oblasti rDNA (ribosomální podjednotky)
D1/D2	oblast LSU rDNA
MK	mastné kyseliny
AMK	aminokyseliny
TAG	triacylglycerol
ER	Endoplazmatické retikulum
I (integr)	integrována produkce
E (eko)	ekologická produkce

9 SEZNAM PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Příspěvky v časopisech s IF

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; VADKERTIOVÁ, R.; OMELKOVÁ, J. Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine. *Chemical Papers*, 2012, roč. 66, č. 9, s. 861-868. ISSN: 0366-6352. Doi: 10.2478/s11696-012-0198-3. (IF = 1,096; počet citací dle WoS = 2)

GOLIĆ, N.; ČADEŽ, N.; TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A.; **ŠURANSKÁ, H.**; BEGANOVIĆ, J.; LOZO, J.; ŠUŠKOVIĆ, J.; RASPOR, P.; TOPISIROVIĆ, L. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain region soft Serbia and lowland region of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*, 2013. V. 166, s. 294-300. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032. (IF = 3,425; počet citací dle WoS = 2)

ŠURANSKÁ, H.; RASPOR, P.; UROIĆ, K.; GOLIĆ, N.; KOS, B.; MIHAJLOVIĆ, S.; BEGANOVIĆ, J.; ŠUŠKOVIĆ, J.; TOPISIROVIĆ, L.; ČADEŽ, N. Culture-independent approach for semi-quantification and characterisation of yeast microbiota in traditional Serbian cheeses. *V oponentním řízení v časopise Food Microbiology*.

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OMELKOVÁ, J. Identification of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Moravian wine and screening their oenological properties for their potential application as the starter culture. *Odesláno do časopisu*.

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OMELKOVÁ, J. Comparison of yeast species diversity in spontaneously fermented Moravian musts grown on integrated and organic vineyard. *Manuscript připravován k odeslání do časopisu*.

Příspěvky v časopisech bez IF (fulltexty)

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OMELKOVÁ, J.; VADKERTIOVÁ, R. Effect of Vineyard Agriculture on Wine Yeasts Population. In *Sborník příspěvků studentské odborné konference Chemie a společnost 2010*. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. s. 180-184. ISBN: 978-80-214-4212- 2. (přednáška v rámci studentské odborné konference)

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OLIVOVÁ, R.; VADKERTIOVÁ, R. *Identification of yeasts species and strains especially Saccharomyces, Hanseniaspora, Rhodotorula and Pichia isolated from the wine by using PCR- RFLP method*. Studentská odborná konference chemie a společnost: Sborník příspěvků. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. s. 252-256. ISBN: 978-80-214-3555- 1. (přednáška v rámci studentské odborné konference)

DVOŘÁK, M.; GREGUŠOVÁ, B.; **ŠURANSKÁ, H.**; TURKOVÁ, K.; POŘÍZKA, J.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. Optimization of the capillary zone electrophoresis method with indirect photometry detection for monitoring of selected organic acid in biotechnological processes. In *Studentská odborná konference Chemie je život 2012 - Sborník příspěvků*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. s. 271-275. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

ŠERÝ, F.; **ŠURANSKÁ, H.**; VRÁNOVÁ, D. Identifikace kvasinek izolovaných v průběhu procesu výroby červeného vína metodou PCR-RFLP. In *Sborník prac z celoslovenskej študentskej vedeckej konferencie*. 1. Trnava, Slovensko: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, 2013. S. 63-67. ISBN: 978-80-8105-449-5.

Příspěvky na mezinárodních konferencích

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OMEKOVÁ, J.; VADKERTIOVÁ, R. *The influence of cultivation of vines for the representation of the genera of yeasts during the process of production of Moravian wines.* 40th Annual Conference on Yeasts. Bratislava: 2012. s. 86-86. ISBN: 1336- 4839.

ČADEŽ, N.; **ŠURANSKÁ, H.;** LOZO, J.; GOLIĆ, N.; KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, J.; TOPISIROVIĆ, L.; RASPOR, P. *Diversity and function of natural yeast microbiota in traditional cheeses produced in Western Balkan countries.* Abstract book of 6th Central European Congress on Food. Novi Sad, Serbia: Novi Sad: University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012. s. 506-506.

ŠURANSKÁ, H.; ČADEŽ, N.; LOZO, L.; TOPISIROVIC, L.; RASPOR, P. *Determination of Natural Yeast Microflora in Cheeses Produced in Western Balkan Countries.* 29th International Specialised Symposium on Yeasts: Book of Abstracts. Guadalajara, Mexico: 2011. s. 98-98. (příspěvek vybrán jako prezentace)

VRÁNOVÁ, D.; **ŠURANSKÁ, H.;** OMEKOVÁ, J.; AUGUSTOVÁ, K.; VADKERTIOVÁ, R. PCR- fingerprinting as a method for identification of *Saccharomyces yeasts* isolated from various Moravian musts. In *39th Annual Conference on Yeasts. 39th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts.* Bratislava: SAS, 2011. s. 113-113. ISSN: 1336- 4839.

ČADEŽ, N.; **ŠURANSKÁ, H.;** LOZO, J.; TOPISIROVIĆ, L.; RASPOR, P. *Diversity of natural yeast microflora in cheeses produced in Western Balkan countries.* Book of abstracts (7th Balkan Congress of Microbiology). Belgrade: Microbiologia Balkanica 2011, 2011.

VRÁNOVÁ, D.; **ŠURANSKÁ, H.;** PALÍKOVÁ, P.; KRÄTSCHMEROVÁ, K. *Comparison of certain regions of rDNA in order to identify of Saccharomyces genus.* 34th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts. Smolenice, Slovensko: 2010. s. 83-83. ISSN: 1336- 4839.

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; KRÄTSCHMEROVÁ, K.; PALÍKOVÁ, P. Identification and comparison of yeasts population isolated from ecological and integrated vineyard by PCR-RFLP method. In *34th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts.* SK: Institute of Chemistry, SAV, 2010. s. 67-67. ISSN: 1336- 4839. (prezentace v rámci sekce Poster Highlights)

VRÁNOVÁ, D.; VADKERTIOVÁ, R.; **ŠURANSKÁ, H.;** OLIVOVÁ, R. Verification of taxonomy of genus yeasts *Hanseniaspora, Pichia, Saccharomyces, Rhodotorula* during fermentation of white wine from Velke Pavlovice. In *37th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts. 34th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts.* Bratislava: SAV Bratislava, 2009. s. 78-78. ISSN: 1336- 4839.

Příspěvky na domácích konferencích

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; JIŘÍKOVÁ, I.; PROCHÁZKOVÁ, L.; VADKERTIOVÁ, R.; OMEKOVÁ, J. Monitoring of Yeasts Population in Ecological and Integrated Produced Moravian wine. In *Chemické listy. Chemické listy.* Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. 1007-1007. ISSN: 0009- 2770.

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OMEKOVÁ, J.; VADKERTIOVÁ, R. *Interdelta- PCR identification of Saccharomyces cerevisiae strains and screening of their oenological characteristics.* Sborník přednášek a posterů. Brno: MU Brno, 2012. s. 172-172.

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; JIŘÍKOVÁ, I.; PROCHÁZKOVÁ, L.; VADKERTIOVÁ, R.; OMEKOVÁ, J. *PCR-RFLP; efficient method for non- Saccharomyces yeasts determination during production of integrated and organic wine.* XV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů: Sborník příspěvků. Brno: Masarykova universita, 2011. s. 95-95. ISBN: 978-80-210-5594- 0.

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; AUGUSTOVÁ, K.; VADKERTIOVÁ, R.; OMEKOVÁ, J. Comparison of *Saccharomyces* strains isolated from two types of wine. In *Chemické listy. Chemické listy.* Praha: Česká společnost chemická, 2011. s. 1005-1005. ISSN: 0009- 2770.

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OLIVOVÁ, R. Identification of yeasts isolated from wine by using PCR- RFLP method. In *XIV. Setkání biochemiků a molekulárních biologů: Sborník příspěvků*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2010. s. 81-82. ISBN: 978-80-210-5164- 5. (3. místo za posterovou prezentaci)

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OMEJKOVÁ, J.; VADKERTIOVÁ, R. *Effect of Vineyard Agriculture on Wine Yeasts Population*. Studentská odborná konference – Chemie a společnost 2010, Sborník abstraktů. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. s. 58-58. ISBN: 978-80-214-4213- 9. 45

DVOŘÁK, M.; GREGUŠOVÁ, B.; **ŠURANSKÁ, H.;** TURKOVÁ, K.; POŘÍZKA, J.; VESPALCOVÁ, M.; RITTICH, B. Optimization of the capillary zone electrophoresis method with indirect photometry detection for monitoring of selected organic acid in biotechnological processes. In *Studentská odborná konference Chemie je život 2012 – Book of abstracts*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. s. 271-275. ISBN: 978-80-214-4644- 1.

ŠURANSKÁ, H.; VRÁNOVÁ, D.; OLIVOVÁ, R.; VADKERTIOVÁ, R. *Identification of yeasts species and strains especially Saccharomyces, Hanseniaspora, Pichia and Rhodotorula isolated from the wine by using PCR-RFLP method*. Studentská odborná konference Chemie a společnost: Sborník abstraktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. s. 69-69. ISBN: 978-80-214-4008- 1.

Přednášky

Prezentace pro střední školy v rámci Mendlových dnů (2011): Význam genetiky pro identifikaci mikroorganismů

Řešené projekty

Inovace výuky předmětu Praktikum z bioinženýrství , zahájení: 01.01.2011, ukončení: 31.12.2011 – **spoluřešitel**.

Inovace praktické blokové úlohy v předmětu Praktikum z biotechnologie, zahájení: 01.01.2012, ukončení: 31.12.2012 – **hlavní řešitel**.

10 SEZNAM PŘÍLOH

- PŘÍLOHA 1:** Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine
- PŘÍLOHA 2:** Comparison of diversity of autochthonous yeast species in spontaneously fermented Moravian musts grown on integrated and organic vineyard
- PŘÍLOHA 3:** Identification of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Moravian wines and screening of their oenological properties for their potential application as the starter culture
- PŘÍLOHA 4:** Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia
- PŘÍLOHA 5:** Culture-independent approach for semi-quantification and characterisation of yeast microbiota in traditional Serbian cheeses
- PŘÍLOHA 6:** Doplnující informace
Seznam použitých sbírkových kmenů *Saccharomyces* (z CCY Bratislava)
Seznam sekvenovaných izolátů

PŘÍLOHA 1

Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine

Hana Šuranská, Dana Vránová, Jiřina Omelková, Renáta Vadkertiová

Chemical Papers, 2012

ORIGINAL PAPER

Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine[‡]^aHana Šuranská*, ^aDana Vránová, ^aJiřina Omelková, ^bRenáta Vadkertiová^aBrno University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Food Science and Biotechnology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic^bInstitute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovakia

Received 27 October 2011; Revised 23 March 2012; Accepted 23 March 2012

In enology, yeasts play an important role in the characteristics of the final product. They are predominant in the biochemical interaction with components of must. Rapid identification of the yeast population is necessary for fermentation process monitoring and for obtaining a good quality wine. The main goal of this study was the isolation and characterisation of the yeast microbial community naturally present on grape berries, leaves and occurring during the spontaneous fermentation process of the white wine Veltlin green from the South Moravian region, Czech Republic. The results, based on PCR-RFLP of the 5.8S-ITS region of rDNA, PCR-fingerprinting using microsatellite oligonucleotide primers (GAG)₅, (GTG)₅, (GAC)₅, and M13 primer, showed great diversity of the yeast population. Including grape berries and fermented must, the following yeast species were identified: *Hanseniaspora uvarum*, *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulasporea delbrueckii*, a number of *Pichia* species such as *P. fermentans*, *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, also *Sporidiobolus salmonicolor*, *Rhodospiridium torulooides*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Rhodotorula glutinis* as well as *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. Monitoring of the yeast strains during the wine fermentation process of traditional Moravian wine can contribute to the improvement of wine quality.

© 2012 Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences

Keywords: wine yeasts, identification, PCR-RFLP, PCR-fingerprinting**Introduction**

Wine fermentation is a complex microbial ecosystem in which different species of yeasts, bacteria and filamentous fungi coexist and take part in the transformation process with their metabolic activities (Fleet & Heard, 1993; Cocolin et al., 2011). Composition of the yeast population on grape berries plays an important role in wine fermentation as different genera, species and strains with their metabolic activities influence the sensory qualities and organoleptic characteristics of wine (Fleet et al., 2002).

Even though the main yeast species *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for the conver-

sion of grape must into wine, generally, the fermentation process is not only the action of a single species or a single strain of yeast (Martini & Vaughan-Martini, 1990; Fleet & Heard, 1993). Yeasts associated with the grape/must ecosystem are usually classified into 15 different yeast genera including *Dekkera/Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, and *Saccharomyces* (Kurtzman & Fell, 1998; Raspor et al., 2006). Since their metabolic activities drive the transformation of grape must into wine, it is essential to understand the behaviour of these mi-

*Corresponding author, e-mail: xcsuranska@fch.vutbr.cz

[‡]Presented at the 5th Meeting on Chemistry & Life 2011, Brno, 14–16 September 2011.

croorganisms and the composition of their population during fermentation in order to obtain final product with the desired organoleptic characteristics (Cocolin et al., 2011).

Classic methods used in yeasts identification are dependent on physiological and morphological tests of conventional taxonomy (Naumov, 1996). However, these phenotypic characteristics tend to be influenced by culture conditions and lead to incorrect identification of yeast strains (Huang et al., 2008). Molecular biology methods enable rapid and precise identification of yeasts at the species or strain level and they have become an important tool in solving industrial problems (Le Jeune et al., 2006).

Various molecular techniques such as electrophoretic karyotyping, random amplified polymorphic DNA using polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and PCR-ribotyping have been used by different authors for the identification of wine yeast species (Raspor et al., 2006). In recent years, two molecular techniques: polymerase chain reaction and restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP) and sequenced analysis of ribosomal DNA (rDNA) region including the 5.8S internal transcribe spacer (ITS) region, have proved to be useful approaches to rapid identification of wine yeast species (Clemente-Jimenez et al., 2004). Also, PCR-fingerprinting employing single primers (SPAR), random primers, repeat motifs, and microsatellite sequences can be used for both inter- and intra-specific discrimination of yeasts (da Silva-Filho et al., 2005). PCR-fingerprinting based on the detection of hypervariable repetitive sequences (mini- and microsatellite DNAs) is favoured to display genetic variability of even closely related individuals of microorganisms (Schuller et al., 2004).

Availability of rapid identification techniques, such as the ones described, permits simple identification of yeast diversity patterns during the early phases of fermentation; the techniques can be useful tools not only in the determination of the must quality, but also in the study of possible presence of non-*Saccharomyces* species specific for different wine regions (Frezier & Dubourdiou, 1992).

The aim of this work was to study yeasts population diversity of indigenous yeasts isolated from grapes, leaves and must in one of the main South Moravian viticulture regions, Velké Pavlovice. Molecular techniques such as PCR-RFLP and PCR-fingerprinting were employed using single repetitive primers. The results were confirmed by standard physiological tests.

Experimental

Yeasts strains, sampling, and yeasts isolation

Yeasts strains used in this study, presented in Table 1, were obtained from Culture Collection of Yeasts,

Bratislava, Slovakia (CCY). Grapes and leaves were collected at the Velké Pavlovice vineyard (September, 2007) situated in the South Moravian region, Czech Republic. The samples of grape must were withdrawn during spontaneous fermentation process in regular intervals. Yeast strains were isolated from the white wine variety Veltlin green. The total of 97 yeast strains were isolated and identified.

Wine fermentation was carried out in a cellar in Velké Pavlovice during the 2007 vintage following the standard procedures. The fermentation process was conducted in a 700 L barrel; 500 kg of grapes were pressed. The cellar temperature was in the range of 12–14°C and the temperature of fermentation was approximately 18°C, the must was spontaneously fermented.

Grape berries, leaves, and must were collected into sterile glasses. The amounts of 15 berries and 10 small pieces of leaves (approximately 1 cm × 1 cm) were inoculated into 200 mL (berries) and 10 mL (leaves) of sterile malt extract medium (MEM) (Brewery Starobno, Czech Republic) and cultivated for ten days. Then, cultures were inoculated onto Petri dishes with MEM supplemented with 250 mg L⁻¹ of streptomycin sulphate (Himedia, India) and 2.5 mL L⁻¹ of propionic acid. The dishes were incubated at 26°C for 3–5 days.

Yeast populations from must were isolated by filtration of fresh must through a Whatman membrane filter (Whatman, Germany) and cultivated as described above. Single colonies were obtained by the Koch's dilution method.

Yeasts isolation and PCR-RFLP of ITS regions

Genomic DNA was isolated from cultures using a commercial kit, UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, USA), according to the manufacture protocol. Finally, 50 µL of a mixture containing 5–30 ng µL⁻¹ of genomic DNA was obtained.

Internal transcribed spacers (ITS) (ITS1 and ITS2) and 5.8S rDNA gene regions were amplified using specific primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTG ATATGC-3') (White et al., 1990). DNA amplification was carried out in the final volume of 50 µL containing 0.2 mM of dNTP (Invitek, Germany), 0.5 µL of each primer (100 pmol µL⁻¹) (VBC Biotech, Germany), PCR reaction buffer (1X) and 1 µmol min⁻¹ of *Taq* DNA polymerase (Kapa Biosystems, USA). PCR conditions were as follows: initial denaturation cycle at 94°C for 4 min followed by 25 cycles of amplification, denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 48°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min; final extension at 72°C for 10 min. The amplification reaction was carried out in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, USA). PCR fragments were separated and de-

Table 1. Size (bp) of the PCR products and restriction fragments (bends) of the collection yeast strains from CCY

Strain	ITS-PCR/bp	HaeIII	HinfI	TaqI	AluI	HhaI	MseI	HpaII
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCY 21-4-96	880	310 + 240 + 180 + 150	350 + 120 + 40	300 + 280 + 140 + 100 + 60	800 + 80	380 + 350 + 140	210 + 180 + 120 + 100 + 80	750 + 120
<i>Saccharomyces bayanus</i> CCY 21-31-12	880	500 + 240 + 150	350 + 120	300 + 280 + 140 + 100 + 60	800 + 80	380 + 350 + 140	210 + 180 + 120 + 100 + 80	750 + 120
<i>Hanseniaspora warrum</i> CCY 46-3-15	750	750	340 + 200 + 160 + 70	400 + 180 + 140 + 60	550 + 180	320 + 110 + 60	240 + 120 + 90 + 60	750
<i>Pichia fermentans</i> CCY 39-4-2	450	350 + 80	250 + 200	200 + 160 + 50 + 40	290 + 120	180 + 100 + 80	450	240 + 150 + 60
<i>Pichia kluyveri</i> CCY 39-31-1	450	380 + 70	250 + 200	170 + 120 + 90 + 70	380 + 70	180 + 110 + 80 + 60	280 + 120 + 50	450
<i>Pichia membranifaciens</i> CCY No.92	450	300 + 80 + 60	250 + 200	200 + 160 + 50	320 + 80 + 60	220 + 100 + 80 + 50	180 + 110 + 50	240 + 150 + 60
<i>Rhodotorula glutinis</i> CCY 20-2-22	650	650	220 + 140 + 100	340 + 220 + 80	320 + 120 + 90	300 + 220 + 100	450 + 80	650
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CCY 20-1-32	650	420 + 220	250 + 100	240 + 180 + 130 + 110	200 + 120 + 90	300 + 220 + 100	200 + 170 + 110	500 + 120
<i>Rhodosporiidium toruloides</i> CCY 62-2-4	650	420 + 220	150 + 120 + 80 + 50	220 + 180	300 + 110 + 90	300 + 220 + 100	480 + 80	500 + 120
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i> CCY 19-5-1	620	620	400 + 220	350 + 220 + 50	380 + 120 + 80	310 + 210 + 100	430 + 90	320 + 300
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> CCY 29-2-74	390	280 + 110	210 + 180	260 + 130	390	200 + 100 + 90	280 + 100	210 + 120 + 60
<i>Torulasporea delbrueckii</i> CCY 41-17-1	800	800	410 + 390	410 + 390	600 + 100	320 + 220 + 150 + 100	210 + 140 + 120	800

Underline bends represent possible multiple fragments obtained by restriction enzymes digestion.

tected by electrophoresis on agarose gel (2 mass %) in TBE buffer (1X) at 5 V cm⁻¹ for 2.5 h. The gel was stained with ethidium bromide (10 mg L⁻¹), visualised under UV light (Ultra Lum. Inc., USA) and documented by the ScionImage software (Scion, India). For RFLP, PCR products were purified by ethanol precipitation and digested by restriction endonucleases *Hae*III, *Hinf*I, *Taq*I, *Alu*I, *Mse*I, *Hha*I, and *Hpa*II (Fermentas, USA) following the manufacturer's instructions. The restriction fragments were separated on agarose gel (2 mass %) under the same conditions as the amplified products.

Representative samples, grouped by PCR-RFLP of ITS regions (one from each created group) were also identified by standard physiological tests (CCY Bratislava, Slovakia) according to Yarrow (1998).

PCR-fingerprinting

Selected isolates were identified by the PCR-fingerprinting method using single repetitive primers (GAG)₅, (GTG)₅, (GAC)₅, and the random primer M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'). Amplification reaction was performed in 50 µL of the total volume containing genomic DNA, 0.2 mM of dNTP (Invitex, Germany), 0.5 µL of primer (100 pmol µL⁻¹) (VBC Biotech, GmbH, Germany), PCR reaction buffer (1X), and 1 µmol min⁻¹ of *Taq* DNA polymerase (Kapa Biosystems, USA).

PCR-assays for (GAG)₅, (GTG)₅, (GAC)₅: initial denaturation cycle was set to 92 °C for 2 min, followed by 35 cycles of the amplification step, denaturation at 92 °C for 2 min, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 3 min; final extension at 72 °C for 5 min.

PCR-assays for M13: initial denaturation cycle at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of amplification followed by denaturation at 93 °C for 0.75 s, annealing at 50 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min; final extension at 72 °C for 6 min.

The amplification products were analysed by electrophoresis in agarose gel (1.4 mass %) at 5 V cm⁻¹ for 3–4 h. The gel was visualised and documented in the same way as in the previous cases.

Finally, electrophoregrams were processed by the BioNumerics 6.5 software employing the UPGMA cluster analysis.

Results and discussion

Yeast strains were isolated from the white wine variety Veltlin green (*Vitis vinifera*) from Velké Pavlovice, one of the four wine regions situated in South Moravia, Czech Republic. The yeasts were isolated from the must during the spontaneous fermentation process (no starter cultures; without SO₂ addition). Samples of must were collected in regular intervals during the whole fermentation process. In addition,

Table 2. Comparison of yeast species isolated from leaves and grape berries of red and white wine varieties identified by the ITS-PCR-RFLP method

Matrices	Identified species	
	White wine	Red wine
	Veltlin green variety	Saint Laurent variety
Leaves	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
	–	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Grapes	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Pichia fermentans</i>
	–	<i>Torulaspota delbrueckii</i>

tion, the grapes and leaves, as sources of yeast species, were also used. Apart from the white wine variety Veltlin green, red wine variety Saint Laurent was also analysed.

In order to identify the yeasts isolated from the matrices mentioned above, PCR-RFLP of ITS regions as a rapid method of yeasts identification at the species level was employed. The ITS1 and ITS4 primers were used to amplify the region of rRNA gene repeating unit which includes two non-coding ITS regions and the 5.8S rRNA gene. This part of DNA was sufficient to obtain polymorphisms; in other words, PCR products revealed a wide range of length variation. Size of the amplified genomic DNA fragments ranged from 390 bp to 880 bp dependent on the yeast genus. Therefore, after PCR amplification using specific ITS1 and ITS4 primers, some yeast strains were distinguishable at the genus level, for instance 880 bp for *Saccharomyces* sp., 750 bp for *Hanseniaspora* sp., 390 bp for *Metschnikowia* sp. (see Table 1). This was the first criterion to distinguish the *Saccharomyces* genus from the other ones.

Then, yeasts were characterised at the species level employing the ITS-PCR-RFLP method. *Saccharomyces* as well as non-*Saccharomyces* yeasts were analysed by means of seven restriction enzymes: *Hae*III, *Hinf*I, *Taq*I, *Alu*I, *Mse*I, *Hha*I, and *Hpa*II. The results based on the PCR-RFLP analysis showed that the yeast communities present in the samples were complex and rich in the number of yeast species. A total number of 13 different species belonging to nine genera was isolated (Table 1).

Grape berries are the primary source of wine yeast species. The results of yeast species colonising the grape berries surfaces of Veltlin green and Saint Laurent varieties from the same sampling location are given in Table 2. Apart from *Hanseniaspora uvarum* which is considered as the most frequent species associated with grapes (Pretorius, 2000) and which was found in both samples, also *Metschnikowia pulcher-*

Table 3. Yeast microbial community isolated from must of the Veltlin green cultivar identified by PCR-RFLP of the 5.8S ITS region of rDNA after different times of fermentation (*t*)

<i>t</i> /day	Identified species
1	<i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kluyveri</i>
3	<i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>
5	<i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Sporidiobolus salmonicolor</i> , <i>Rhodospiridium toruloides</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
7	<i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia kluyveri</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces bayanus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
9	<i>Pichia fermentans</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
11	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
13	<i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
17	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

rima (Veltlin green variety), *Pichia fermentans*, and *Torulasporea delbrueckii* (Saint Laurent variety) were identified on the surface of grape berries. Both *M. pulcherrima* and *P. fermentans* were previously identified as common yeast species associated with grape berries (Jolly et al., 2006). Also *T. delbrueckii* was isolated from the grapes of an undefined variety as reported by Renouf et al. (2007).

Yeast microbial community was studied also on leaves (see Table 2). Black yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*, which is the most common yeast on immature grape berries, was isolated from the leaves surfaces of both varieties. *A. pullulans* is the most widespread saprophyte in the phyllosphere and it is considered to be a potential biocontrol agent against grey mould (Scheda et al., 2003; Raspor et al., 2006). Aside from *A. pullulans*, *Rhodotorula glutinis* in both varieties and *H. uvarum* only in the Saint Laurent variety were also identified.

Finally, yeast population was monitored during the fermentation process. In the early stages of the spontaneous fermentation process, most *Pichia* species especially *P. kluyveri*, *P. membranifaciens*, *P. fermentans* as well as apiculate ascomycetous yeast *H. uvarum* were found in the must. *H. uvarum* occurred in the must until the fifth day of wine fermentation and also on the grapes of both varieties (Table 3). In addition to *Saccharomyces* sp., six different species were found. Basidiomycetous yeasts such as *Rh. mucilaginosa*, *Rhodospiridium toruloides*, and *Sporidiobolus salmonicolor* and ascomycetous *H. uvarum*, *P. kluyveri*, and *P. fermentans* (Table 3) were also identified. Brežná et al. (2010) isolated very similar species (for instance *H. uvarum*, *Rh. toruloides*, *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, etc.) from the white wine Veltlin from the Slovakia wine region.

In general, the non-*Saccharomyces* yeasts naturally present in wine fermentations are metabolically active and their metabolites can influence wine quality. Although often seen as a source of microbial spoilage, there is substantial contrary evidence pointing to positive contribution of these yeasts (Jolly et al., 2006).

For instance *P. membranifaciens* and other yeasts of the genera *Candida*, *Pichia*, and *Hansenula* are capable of oxidising ethanol, glycerol, and acids resulting in wines with unacceptably high levels of acetaldehyde, esters, and acetic acids (Fleet, 2001). Other obligate aerobes (for instance *Rhodotorula* sp., *Rhodospiridium* sp., and *Sporidiobolus* sp.) are regarded as indicators of hygiene and of the stringency in avoiding wine contact with air (Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003). On the contrary, as reported by Pretorius (2000), *Hanseniaspora* sp. is most predominant during the initial period of fermentation, until the increase of ethanol concentration levels up to 3–4 mass % and it contributes to the wine quality by the production of some desirable volatile compounds.

Furthermore, *Saccharomyces* sp., the main yeast contributing to alcohol formation, was found in later fermentation phases (since the 5th day until the 19th day). These strains were not detected by direct agar plating procedures from grapes and initial must. This fact was probably caused by too low counts of the *Saccharomyces* sp. population (> 10–100 colony-forming units per cm²) on the grapes and in the early must (Fleet et al., 2002). At the fifth day of fermentation, the yeast population was very diverse.

Generally, characterisation of the *Saccharomyces* genus at the species level by PCR-RFLP of the ITS regions is very difficult because of very similar restriction patterns of all species of the *Saccharomyces* sensu stricto group (Fig. 1). Therefore, different researchers reported difficulties in distinguishing the yeast species belonging to the *Saccharomyces* genus (dos Santos et al., 2007). The only exception is the application of the restriction enzyme *HaeIII*. In this case it is possible to distinguish *S. cerevisiae* from *S. bayanus* (Table 1) (Esteve-Zarzoso et al., 1999).

PCR-fingerprinting was used to identify the *Saccharomyces* genus at the species level. Besides the application of the seven mentioned restriction enzymes, *Saccharomyces* yeast strains (amplicon 880 bp) were analysed by PCR-fingerprinting (rep-PCR with microsatellite oligonucleotide primers and M13 primer).

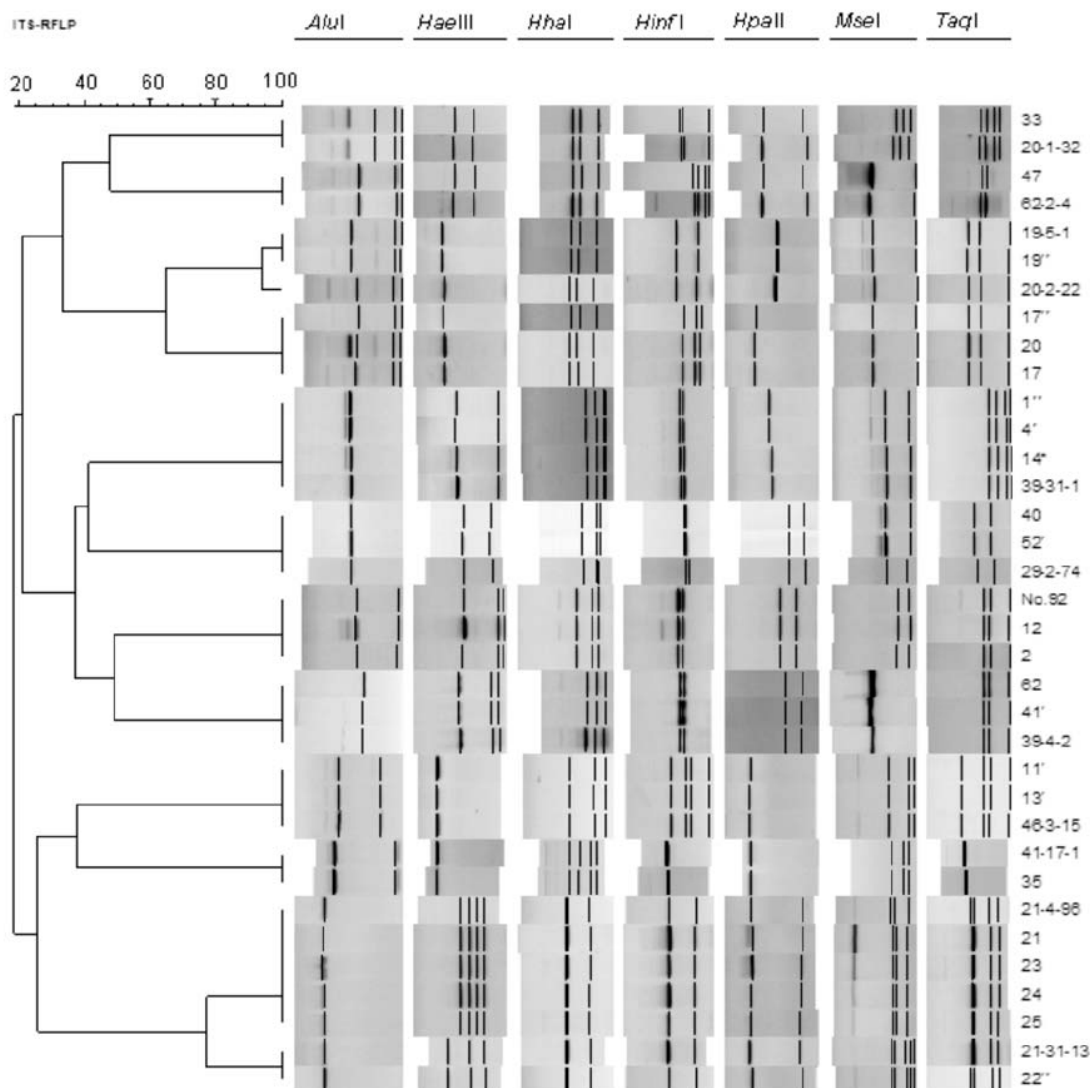


Fig. 1. Phylogenetic relationship of representative yeast species isolated from berries and must of *Vitis vinifera*, cultivar Veltlin green in comparison with collection yeast strains (20-1-32 *Rh. mucilaginosa*, 62-2-4 *Rh. toruloides*, 19-5-1 *Sp. salmonicolor*, 20-2-22 *Rh. glutinis*, 39-31-1 *P. kluyveri*, 29-2-74 *M. pulcherrima*, No. 92 *P. membranifaciens*, 39-4-2 *P. fermentans*, 46-3-15 *H. uvarum*, 41-17-1 *T. delbrueckii*, 21-4-96 *S. cerevisiae*, 21-31-13 *S. bayanus*). Results are based on the similarity of the ITS-RFLP patterns.

These methods generated reproducible fingerprints composed of a number of distributed bands of different size and intensity. Similarities in the band patterns (profiles) were compared and yeasts at the species level were classified (Fig. 2). In summary, one isolated strain was identified as *S. bayanus* and the rest of isolates was classified as *S. cerevisiae*.

According to our results, some yeast species occurred only on grapes and leaves but they did not contribute to the fermentation process (*A. pullulans*, *Rh. glutinis*, *M. pulcherrima*). This may be caused by the fact that at the beginning of the fermentation process, these yeasts occur in very low counts, below the limit of detection of our methods. Con-

sequently, during the fermentation, they were suppressed by the fast growing yeasts. Oppositely, there are a number of yeasts (*Pichia* sp.) which were not detected on grapes or leaves but they were observed in fermented must. It is likely that these yeast species come from the cellar or equipment used for grape processing.

Of course, the presented results could be influenced by the fact that a culture dependent approach was used and thus fast growing yeasts were selected in the cultivation in the malt extract medium. Therefore, the obtained results will be confirmed by the application of a culture independent method such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

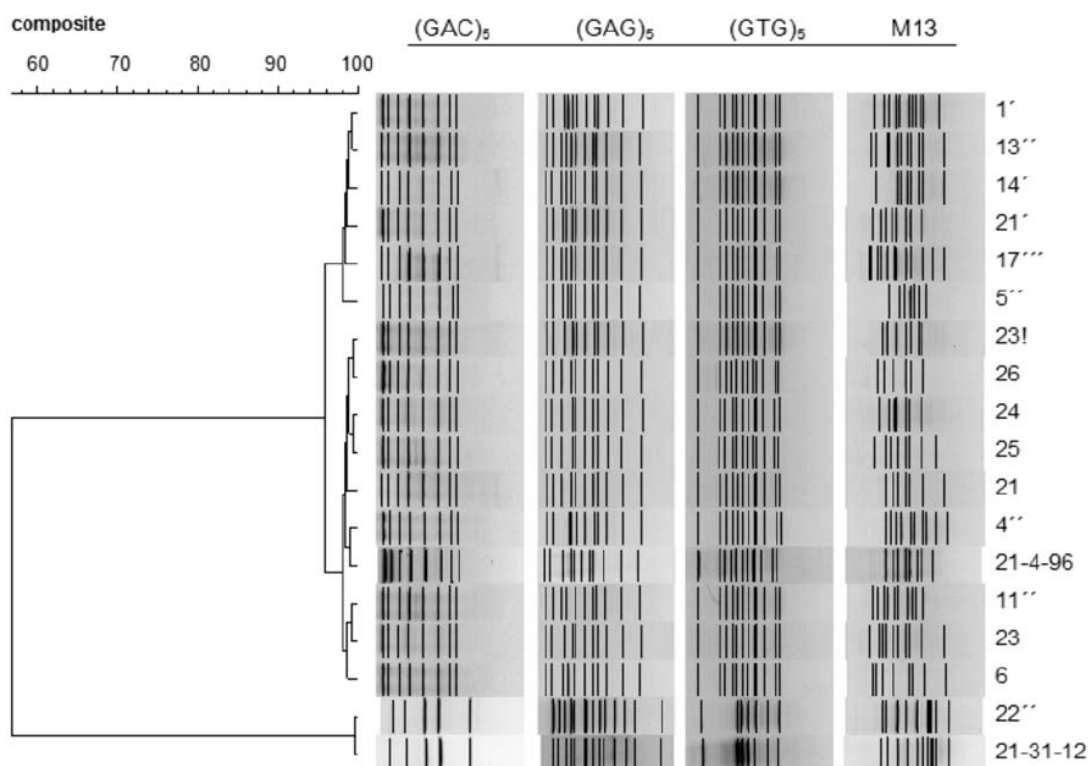


Fig. 2. Dendrogram based on the similarity of PCR-fingerprinting patterns of isolates identified as *S. cerevisiae* and *S. bayanus* (isolated from must of the cultivar Veltlin green) compared with the PCR-fingerprinting bands profiles of collection strains *S. cerevisiae* CCY 21-4-96 and *S. bayanus* CCY 21-31-12.

Conclusions

To summarise, molecular methods were employed for yeasts identification. PCR-RFLP of the ITS region, PCR-fingerprinting using microsatellite oligonucleotide primers and primer M13 were also applied. A combination of these methods for rapid and suitable identification of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* wine yeasts at the species level was employed. Furthermore, it was possible to distinguish all the yeasts species. To our knowledge, this is the first study regarding yeast diversity in the wine-making procedure in the traditional South Moravian wine region.

Application of molecular techniques in order to identify microorganisms isolated from different food matrices (in our case wine production) and environments offers a number of advantages over traditional methods particularly speed, precision and simplification of data interpretation.

This complex study provides more information about the yeast communities on the berries and in grape must. Generally, monitoring of the wine-making process can help to avoid wine spoilage and to obtain high quality wine.

Acknowledgements. This work was supported by a project of

the Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic (grant No. MSM 0021630501) and by the Standard Project of Specific Research No. FCH-S-11-7.

References

- Brežná, B., Ženišová, K., Chovanová, K., Chebeňová, V., Kraková, L., Kuchta, T., & Pangallo, D. (2010). Evaluation of fungal and yeast diversity in Slovakian wine-related communities. *Antonie van Leeuwenhoek*, *98*, 519–529. DOI: 10.1007/s10482-010-9469-6.
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., & Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization of oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, *21*, 149–155. DOI: 10.1016/s0740-0020(03)00063-7.
- Cocolin, L., Campolongo, S., Alessandria, V., Dolci, P., & Rantsiou, K. (2011). Culture independent analyses and wine fermentation: an overview of achievements 10 years after first application. *Annals of Microbiology*, *61*, 17–23. DOI: 10.1007/s13213-010-0076-6.
- Da Silva-Filho, E. A., dos Santos, S. K. B., do Monte Resende, A., de Morais, J. O. F., de Morais, M. A., Jr., & Simões, D. A. (2005). Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, *88*, 13–23. DOI: 10.1007/s10482-004-7283-8.
- Dos Santos, S. K. B., Basílio, A. C. M., Brasileiro, B. T. R. V., Simões, D. A., da Silva-Filho, E. A., & de Morais, M.,

- Jr. (2007). Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCR-fingerprinting. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23, 1613–1620. DOI: 10.1007/s11274-007-9407-6.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329–337. DOI: 10.1099/00207713-49-1-329.
- Fleet, G. H. (2001). Wine. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montville (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (2nd ed., pp. 747–772). Washington, DC, USA: ASM Press.
- Fleet, G. H., & Heard, G. M. (1993). Yeast—growth during fermentation. In G. H. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology* (Chapter 2, pp. 27–54). New York, NY, USA: Taylor & Francis.
- Fleet, G. H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A. L., & Heard, G. M. (2002). The yeast ecology of wine grapes. In M. Ciani (Ed.), *Biodiversity and biotechnology of wine yeasts* (pp. 1–17). Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost.
- Frezier, V. & Dubourdieu, D. (1992). Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 375–380.
- Huang, C. H., Lee, F. L., & Tai, C. J. (2008) A novel specific DNA marker in *Saccharomyces bayanus* for species identification of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Microbiological Methods*, 75, 531–534. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.08.005.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 15–39.
- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (1998). Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: C. P. Kurtzman, & J. W. Fell (Eds.), *The yeasts, a taxonomic study* (4th ed., pp. 3–5). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., & Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 23, 709–716. DOI: 10.1016/j.fm.2006.02.007.
- Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 23–50. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00246-0.
- Martini, A., & Vaughan-Martini, A. (1990). Grape must fermentation: past and present. In J. F. T. Spencer, & D. M. Spencer (Eds.), *Yeast technology* (pp. 105–123). Berlin, Germany: Springer.
- Naumov, G. I. (1996). Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 295–302. DOI: 10.1007/bf01574704.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675–729. DOI: 10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B.
- Raspor, P., Milek, D. M., Polanc, J., Možina, S. S., & Čadež, N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 97–102. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.017.
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 149–164. DOI: 10.1007/s00253-006-0798-3.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., & Ippolito, A. (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 209–220. DOI: 10.1016/s0925-5214(03)00111-x.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., & Casal, M. (2004). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*, 231, 19–26. DOI: 10.1016/s0378-1097(03)00928-5.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninski, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). London, UK: Academic Press.
- Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In C. P. Kurtzman, & J. W. Fell (Eds.), *The yeasts, a taxonomic study* (4th ed., pp. 77–100). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.

PŘÍLOHA 2

Comparison of diversity of autochthonous yeast species in spontaneously fermented Moravian musts grown on integrated and organic vineyard

Hana Šuranská, Dana Vránová, Jiřina Omelková

(připravováno k odeslání)

Title:**Comparison of diversity of autochthonous yeast species in spontaneously fermented Moravian musts grown on integrated and organic vineyard**

^aHana Šuranská, ^aDana Vránová, ^aJiřina Omelková

^a*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Food Science and Biotechnology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic*

Key words

Wine Yeasts, organic farming, integrated farming, yeast identification,

Abstract

The aim of this study was to evaluate the influence of agricultural mode - organic and integrated farming – on composition of yeast population during spontaneous wine fermentation. To reach this goal, both culture-dependant (ITS-PCR-RFLP) as well as culture-independent (LSU-DGGE) approaches of molecular identification techniques were employed to study yeast consortium of Pinot noir and Sauvignon blanc, both produced by organic and integrated farming. Both methods revealed minor, however significant, differences in yeast consortium, which were the most evident during initial stage of must fermentation (the 3rd – 7th day of fermentation). Higher variability of yeast populations was observed in wines produced by organic farming, which might indicate that restricted application of chemicals, such as pesticides or fertilizers, may have positive effect on wine-yeast diversity.

Introduction

Wine fermentation is complex microbial ecosystem with both yeasts and bacteria taking part in the transformation process with their metabolic activities (Fleet and Heard, 1993; Raspor et al., 2006). In general, yeasts predominate during the alcoholic fermentation, where the low pH and nutritional content of the grape must itself select for yeast growth. A diverse population of yeasts including species of *Hanseniaspora* sp. (*Kloeckera* sp.), *Metschnikowia* sp., *Candida* sp. and *Saccharomyces* sp. are often present in the initial stages of most wine fermentations. The non-*Saccharomyces* yeasts typically grow for several days before the fermentation is dominated by one or more *Saccharomyces cerevisiae* strains along with a concurrent increase in ethanol concentration (Cocolin et al, 2000). The diversity of indigenous yeast strains can result in wines with different qualities and peculiar flavours (Hensche, 1999; Fleet, 2003; Jolly et al., 2006).

Further, biotechnological approaches to winemaking are used in several aspects of the fermentation industry, such as formulation and use of selected starter cultures, monitoring of microbial populations, and control of spoilage yeasts (Pretorius, 2000; Ciani and Comitini, 2011). The microbial communities composition and their proportions on grapes and then in must may be affected by a large number of factors such as climatic conditions, vineyard treatments, geographic locations grape variety, vintage year and other factors usually related to particular vineyard (Fleet et al., 2002).

Organic grapes come from vineyards grown under organic farming methods, as defined at European level by the European Council (EC) Regulation No834/2007 and No.889/2008 on organic production (Trioli and Hofmann, 2009). Organic wine is made from grapes grown without application of synthetic chemicals such as fertilisers or herbicides. On the other hand, in integrated farming (typically agriculture for Czech Republic wine region) application of small amount of selected synthetic fertilisers, (those which are considered being gentle to environment) is allowed.

Since yeast composition is influenced by agriculture techniques employed, it is likely that composition of indigenous yeast consortium on wine berries from integrated and organic farming will differ, which, consequently, will influence characteristics of wine produced.

In recent years, two molecular techniques, polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and sequence analyses of the ribosomal DNA (rDNA) region including 5.8S internal transcribed spacer (ITS) region, have proved to be useful for rapid identification of wine yeast species (Granchi et al., 1999). Apart from culture dependent techniques, also direct yeasts profiling employing T/DGEE is used (Prakitchaiwattana et al., 2004; Coppola et al., 2008; Jany a Barbier, 2008).

The main goal of this study was to determine the autochthonous yeast species isolated from spontaneously fermented musts of Pinot noir and Sauvignon blanc. The grapes of both varieties were grown under integrated and organic farming according to the procedures allowed by these farming processes. The yeast communities were determined by culture isolation and on the other hand by direct DNA profiling using gradient gel electrophoresis (LSU-DGGE). The yeast species isolated by culture-dependent method was identified by ITS-PCR-RFLP and the representatives were confirmed by partial ITS sequencing.

Material and methods

Sampling and yeasts isolation and dynamics

Wine fermentation was carried out in the cellar in small vinery in South Moravia (Czech Republic) during the 2011 vintage following the standard procedures. The fermentation process was conducted in a 200 L barrel; 100 kg of grapes was pressed. The cellar temperature was in range of 12 – 14 °C and the temperature of fermentation was approx. 18 °C, the must was spontaneously fermented. We analysed Pinot noir (red wine) and Sauvignon blanc (white wine).

Yeast species were isolated from musts during the whole fermentation process. Yeast populations from must were isolated by filtration of approximately 300 mL of fresh must through Whatman membrane filter (Whatman, Germany) and cultivated on Malt Extract Medium MEM (Brewery Starobrnno, Czech Republic) at 26 °C for 3 – 5 days. The single colonies were obtained by Koch's dilution method.

Further, yeast species were also isolated by standard Koch's dilution method. This method allows count yeast species.

ITS-PCR-RFLP and partial sequencing

Genomic DNA was isolated from single colonies by commercial kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, USA) according to the manufacture protocol.

The internal transcribed spacers (ITS) (ITS1 and ITS2) and 5.8S rDNA gene regions were amplified by using specific primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) as described previously by Šuranská et al. (2012).

PCR fragments were separated and detected by electrophoresis on 2% (w/v) agarose gel in 1 × TBE buffer at 5 V·cm⁻¹ for 2 hours. The gel was stained by ethidium bromide (10 mg·mL⁻¹), visualized under UV light (Ultra Lum. INC, USA) and documented by ScionImage software (Scion, India). For RFLP, PCR products were purified by ethanol precipitation and digested by restriction endonucleases *HaeIII*, *HinfI* and *TaqI* (Fermentas, USA) following the manufacturer's instructions. The restriction fragments were separated on 2% agarose gel under the same conditions as the amplified products.

Representative samples, grouped after PCR-RFLP of ITS regions analysis (one from each created group) were also identified by standard physiological tests (CCY Bratislava, Slovakia) according to Yarrow (1998) and the identity of representative species were confirmed by partial ITS sequencing provided by Elisabeth Pharmacon s.r.o. (Czech Republic). Sequence similarity searches were performed using BLAST service of NCBI database.

LSU-DGGE

Total DNA was isolated from 10 mL of the must sample. The cells were collected by centrifugation at 10 000 rpm for 4 minutes at 4 °C. After centrifugation, the cells were washed by physiological buffer and centrifuged again. Further, DNA was isolated by UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, USA) as described above.

LSU rDNA (D1/D2 region of 26S rDNA gene) was amplified using eukaryotic universal primers NL1 (GC clamp) and LS2 designed by Cocolin et al. (2000). DNA amplification was carried out in the final volume of 25 µL containing 1 × PCR reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 µM of each dNTP, 0.5 µM of each primer and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase. PCR conditions were as follows: initial denaturation cycle at 95 °C for 5 minutes, followed by 30 cycles of amplification – denaturation at 95 °C for 1 minute, annealing at 52 °C for 2 minutes and extension at 72 °C for 2 minutes and the final extension at 72 °C for 7 minutes.

PCR products were separated in sequence-specific manner using INGENYphorU-system (Ingeny, Netherlands) in the 6% polyacrylamide gradient gel (acrylamide-bisacrylamide 37.5:1) with 30 to 60% denaturing gradient formed by 7 M urea and 40% formamide in a 1 × TAE running buffer. Electrophoresis was performed at a constant voltage 170 V for 6.5 hours at constant temperature of 60 °C. Ethidium bromide (0.5 mg·mL⁻¹) stained DNA bands were visualized under UV light.

Statistical evaluation of data

Shannon-Wiener index (H') and Simpson's index (D) to estimate general biodiversity and dominance of the species in each sample were used. Indexes were calculated according to Golić et al. (2013).

The final restriction fragments of all identified species were grouped by BioNumerics 6.5 software using UPGMA cluster analysis.

Results and discussion

The yeast species associated with the fermentation of traditional Moravian wines coming from Czech Republic were determined by culture-dependent ITS-PCR-RFLP as well as culture-independent LSU-DGGE technique. The yeast species were monitored during whole fermentation process of white and red wine production during vintage 2011. The musts were spontaneously fermented; no SO₂ and no starter culture were used. Two wine varieties Pinot Noir (Pn; red wine) and Sauvignon blanc (Sg; white wine) were used. These varieties are typical for traditional wine region of South Moravia, Czech Republic. Grapes of both varieties were grown under two agriculture techniques – organic (O) and integrated (I).

Total yeast counts of all the tested wines during whole fermentation process are shown in Figure 1. The yeast counts of the initial fresh musts SgI and SgO (immediately after berries pressed) were very similar (approx. 5 log CFU·mL⁻¹), whereas the yeast counts for PnI and PnO differed 10 times. Interestingly, yeast population detected in PnO must was the same as in the case of SgI and SgO (5 log CFU·mL⁻¹). On the other hand, the total yeast count for PnI was significantly lower. Further, from Figure 1 is evident that the yeast population reached maximum in the 11th day of SgI; SgO and PnO musts fermentation (9 log CFU·mL⁻¹) and PnI in the 9th day (10 log CFU·mL⁻¹).

As reported Tofalo et al. (2011) the total yeast counts of must from organic berries reached maximum at 14 day (7 log CFU·mL⁻¹). Based on our results our data showed that yeasts population reached maximum concentration value in 11 day. The divergences can be caused by many factors including grape, climatic and regional varieties or technology of wine production.

The yeast species were identified by cultivation-based ITS-PCR-RFLP method. ITS amplicons of rDNA were digested by three restriction endonucleases *Hae*III, *Hin*fl and *Taq*I. The final results connected by distribution in each sample and relative abundance of identified species are stated in Table 1 and 2. Besides *S. cerevisiae* strains, *H. uvarum*, *P. cecembensis*, *C. zemplinina*, *P. fermentans*, *C. ethanolica*, *P. membranifaciens*, *I. orientalis* and *Z. florentinus* were detected in Pinot Noir musts. The same species were detected also in Sauvignon blanc must. Moreover, *T. delbrueckii* and

basidiomycetous yeast species *R. mucilaginosa* were detected in the first day of the fermentation process (Sg must). *Hanseniaspora uvarum* was predominant at the first stages of fermentation for both varieties and both agriculture techniques. If we compare yeast species isolated from Sauvignon variety, some species such *I. orientalis* and *C. ethanolica* were isolated only from ecologically treatment variety. On the other hand, *I. orientalis* was isolated from musts of integrated treated Pinot noir variety. It is generally accepted that non-*Saccharomyces* species influence the organoleptic properties (Fleet, 2003; Jolly et al., 2003b a Ciani et al., 2010). For instance *I. orientalis* is able to degrade malic acid and enhance aroma. Further *Pichia* species, which are generally considered as contaminants, are able to enhance aroma as *I. orientalis* and *H. uvarum* contribute to flavour complexity (Ugliano and Henschel, 2009; Rojas et al., 2003).

The relative abundance of individual yeast species determined by culture-dependent ITS-PCR-RFLP is shown in Table 1 and 2. Generally, in Pinot noir red wine as well as Sauvignon noir white wine, *H. uvarum* was the most abundant yeast species in the initial stage of wine fermentation regardless of the mode of agriculture employed. On the contrary, *S. cerevisiae* appeared sooner in wines produced by integrated farming (the 3rd day of fermentation) than in organically produced wine (the 7th day of fermentation) and, moreover, its portion was significantly higher during middle stage of fermentation in wine produced by integrated farming than in organic farming. Divergences in composition of yeast consortium between wines produced by integrated and organic farming were more apparent in case of white wine. SnO revealed higher number of yeast species than SnI and, similarly, also higher values of ecological coefficients, which may indicate that restriction of chemical fertilizers and herbicides may enhance diversity of yeast consortium in vineyard and, in consequence, in spontaneously fermented must.

Correlation between abundance of individual yeast species for wine produced by integrated and organic farming during entire fermentation is shown in Fig. 2. Interestingly, for both wines, the difference is the most significant during middle stage of fermentation (between the 3rd and 9th days) until *S. cerevisiae* definitely took over the process. It is likely that the process of fermentation

stressed even small divergences in yeast consortium and, therefore, the correlation coefficient decreased.

Apart from culture-dependant ITS-PCR-RFLP, yeast community was studied also by culture independent approach composing of direct DNA isolation, amplification of LSU subunit by universal eukaryotic primers and separation of amplicons by DGGE. Unlike cultivation requiring approaches, LSU-DGGE enables detection and identification of cells which are none-cultivable. On the other side, LSU-DGGE does not provide information concerning abundance of individual species and moreover, the results can be partially influenced by detection of death cells or plant DNA. Therefore, Golic et al. 2013 pointed out that combination of culture-dependant and culture-independent methods of yeast identification is the most suitable approach to study yeast community in foods and beverages.

Data obtained by LSU-DGGE were evaluated using Software BioNumerics and transformed into dendrogram which is shown in Figure 3 and additional information including Pearson coefficient and number of different bands (organic versus integrated farming) are provided in the table 3. Similarly to results of ITS-PCR-RFLP also data of LSU-DGGE reflect minor, however, significant divergences between yeast consortiums of must produce by integrated and organic agricultural approach. The fact, that number of different bands identified by LSU-DGGE was higher than number of different species identified by ITS-PCR-RFLP, may be attributed to detection of none-cultivable or death yeast cells. Also in LSU-DGGE, the highest diversity of yeast population was observed in the early-middle stage of wine fermentation, especially days 3-7 (see Pearson coefficients) and the higher diversity of yeast population revealed must produce from grapes grown employing organic farming.

To sum up, the result of proposed study indicated that composition of yeast population during spontaneous production of wine is influenced by mode of agriculture employed. Generally, it seems that implication of organic farming with strictly restricted application of chemical fertilizers and pesticides results in higher diversity of the yeast population, which may, in turn, influence sensoric properties of the wine. Nevertheless, the data of this screening study should be confirmed on

broader group of samples (wines from various regions grown either using organic or integrated approach) to support this observation by statistically significant results.

Acknowledgment

This work was supported by a project of MŠMT ČR (Grant No. MSM 0021630501) and by a Standard project of specific research No.FCH-S-13-1912.

References

- Fleet, G.H.; Heard, G.M. (1993). Yeast-growth during fermentation. In G.H. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology* (Chapter 2, pp. 27 – 54). New York, NY, USA: Taylor and Francis.
- Raspor, P., Miklič Milek, D., Polanc, J., Smole Možina, 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, v. 109, s. 97 – 102. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.017.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. Direct profiling of the dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, v. 189, s. 81 – 87. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09210.x
- Henschke, P. Wine yeast. In: Zimmerman, F.K.; Entian, K.D.: *Yeast Sugar Metabolism, Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Applications*. Technomic Publishing, Lancaster, UK. 1997, p. 567. ISBN-10: 1566764661.
- Jolly, N.P.; Augustyn, O.P.H.; Pretorius, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2006, v. 27, s. 15-39.
- Fleet, G.H. Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 86, s. 11 – 22. doi:10.1016/S0168-1605(03)00245-9.
- Ciani, M., Comitini, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts wine yeasts have promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of Microbiology*. 2011, v. 61, s. 25-32. doi: 10.1007/s13213-010-0069-5.
- Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 2000, v. 16, s. 675-729. DOI: 10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675::AID-YEA585>3.0.CO;2-B.
- Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C., Beh, A.L., Heard, G.M. The yeast ecology of wine grapes. Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts. *Research Singpost, Kerala, India*, 2002. s. 1 – 17.

- Prakitchaiwattana, Ch.J., Fleet, G.H., Heard, G. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*. 2004, v. 4, s. 865 – 877. DOI: 10.1016/j.femsyr.2004.05.004.
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzi, 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, v. 87, s. 949-956. Doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00600.x.
- Coppola, S.; Blaiotta, G.; Ercolini, D. *Dairy products: In Molecular techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. Editor Cocolin, L.; Ercolini, D. Springer, New York, 2008, p. 31-90.
- Jany, J-L., Barbier, G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*. 2008, v. 25, s. 839 – 848. Doi: 10.1016/j.fm.2008.06.003.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, (Innis N., D. Gelfand, J. Sninsky, T. White, eds.), 1990, s. 315-322. London: Academic Press.
- Šuranská, H.; Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine. *Chemical Papers*, 2012. V. 66 (9), pp. 861-868. Doi: 10.2478/s11696-012-0198-3.
- Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Šušković, J., Raspor, P., & Topisirović, L. (2013). Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 294–300.
- Tofalo, R., Schirone, M., Teler, G.C., Manetta, A.Ch., Corsetti, A., Suzzi, G. Influence of organic viticulture on non-Saccharomyces wine yeast populations. *Annals of Microbiology*, 2011. V. 61, pp. 57-66. Doi:10.1007/s13213-010-0102-8.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*. 2003b, v. 24, s. 63 – 69.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*. 2010, v. 10, s. 123-133. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x.
- Rojas, V., Gil, J., Pinaga, F., Manzanares, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, v. 86, s. 181 – 188. doi:10.1016/S0168-1605(03)00255-1.
- Ugliano, M., Henschke, P.A. *Yeast wine and flavor*. In. *Wine chemistry and biochemistry*. Editor MORENO-ARRIBAS, M., POLO, M. New York: Springer, c2009, s. 313-393. ISBN 9780387741185.

Figure 1: Total yeasts counts (CFU·mL⁻¹) for Sauvignon (A) and Pinot noir (B) variety coming from integrated and organic vineyard. The standard deviations were not higher than 10 %.

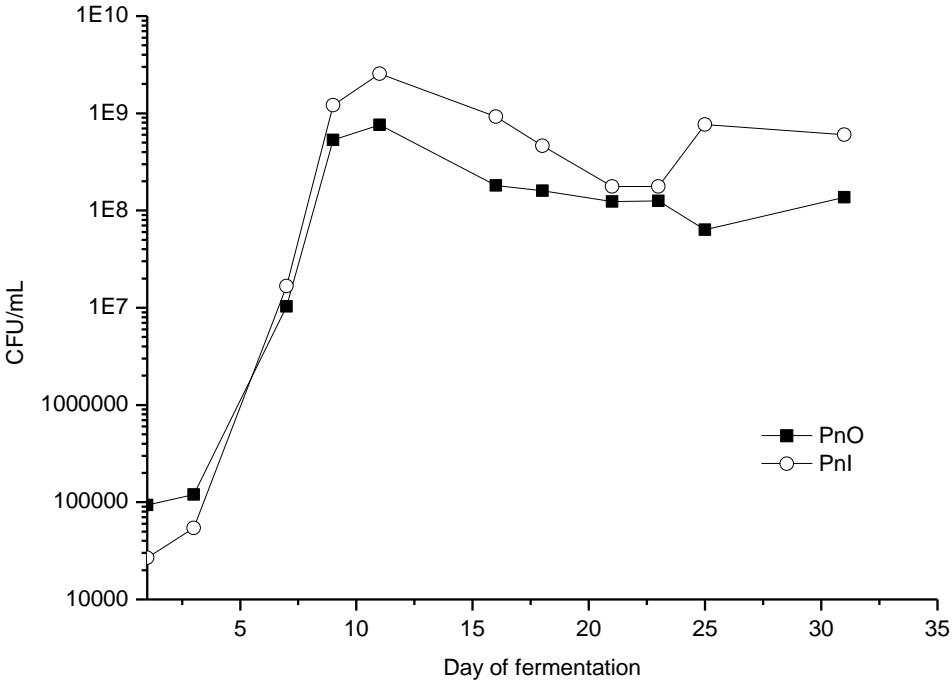
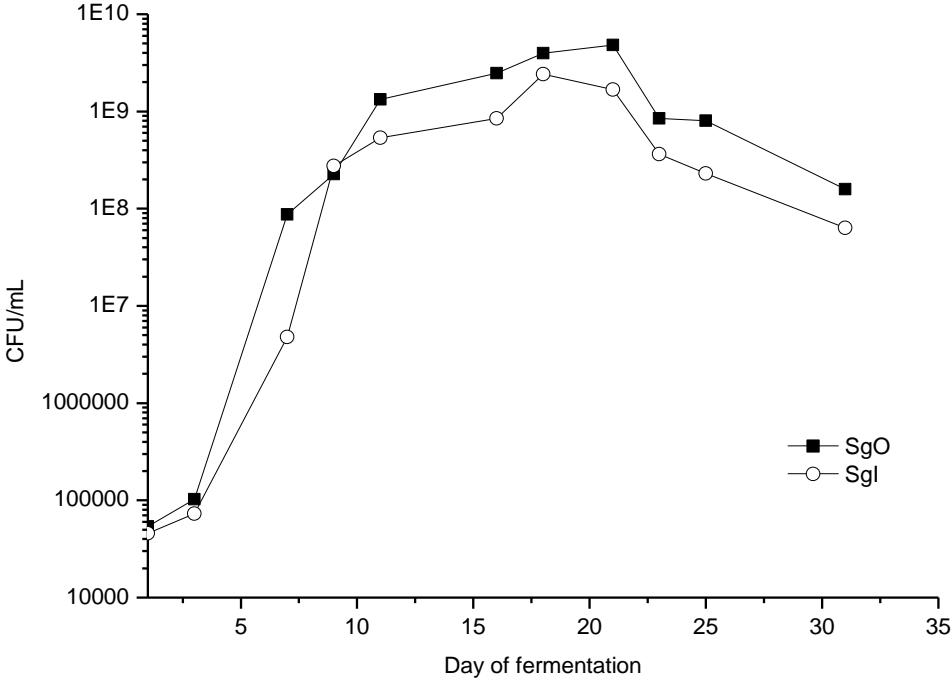


Figure 2 Time course of correlation between yeast population composition of wines produced by intergrated and organic farming. The correlation was determined based on the relative abundance of individual species determined by ITS-PCR-RFLP.

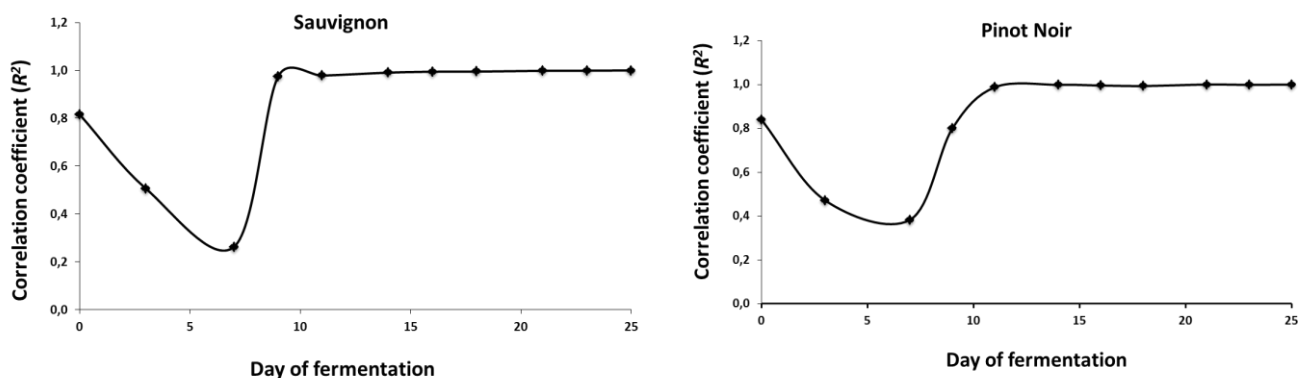


Figure 3 Dendrograms constructed based on results of LSU-DGGE.

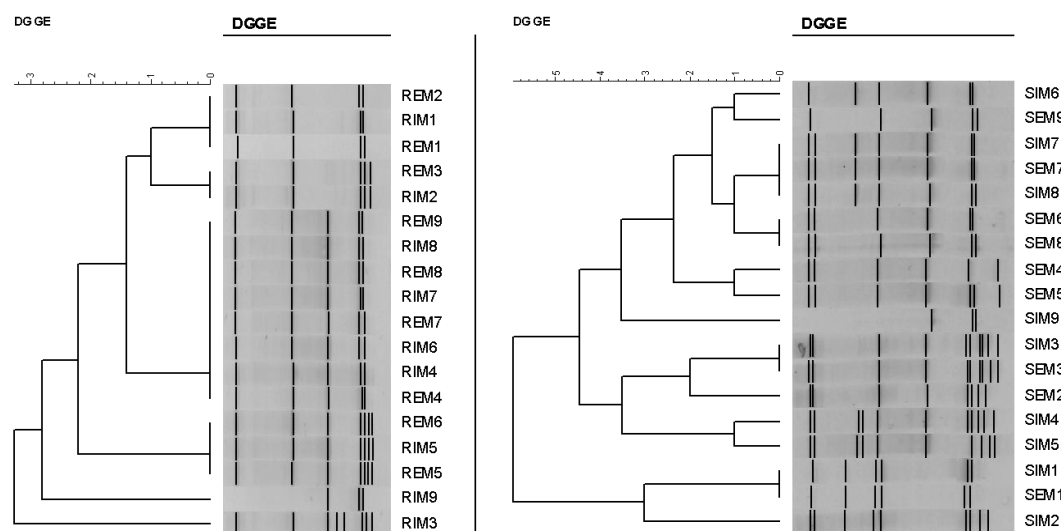


Table 3: Statistic evaluation of yeast LSU-DGGE profiles. We evaluated differences in yeast population direct isolated from *Sgl* × *SgO* and *Pnl* × *PnO* must samples.

		Day of fermentation/Sampling day							
		1	3	7	9	11	14	16	21
Sauvignon	Pearson correlation (%)	86	63	69	76	85	84	87	81
	N of different bands (tolerance 3 %)	5	4	4	7	5	5	3	3
Pignot noir	Pearson correlation (%)	93	86	82	93	94	86	89	92
	N of different bands (tolerance 3 %)	0	1	3	0	0	2	0	0

Table 1: Frequency of yeast species occurrence (%) isolated during spontaneous red wine Pinot Noir fermentation.

Yeast species	PINOT NOIR (Pn)																					
	ORGANIC (PnO)											INTEGRATED (PnI)										
	Day of fermentation (sampling day)																					
	1	3	7	9	11	14	16	18	21	23	25	1	3	7	9	11	14	16	18	21	23	25
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	51 ^a	64	58	33								55	46	25	5							
<i>Pichia cecembensis</i>	11	15	8	1								8	8	10		2	3	2	5	1	2	
<i>Candida zemplinina</i>	19	12										10	4									
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	4	2																				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			24	62	89	95	94	93	99	97	98		38	53	94	94	92	93	92	99	98	100
<i>Pichia fermentans</i>	7	4	2	2	11							15	3		2	2		1				
<i>Candida ethanolica</i>						5	6	1				12		11	2		4	1	2			
<i>Pichia membranifaciens</i>	8	3	8	3				6	1	3	2			1				2	1			
<i>Issatchenkia orientalis</i>													1			2	1	1				
No. of different species	6	6	5	5	2	2	2	3	2	2	2	6	6	5	4	4	4	6	4	2	2	1
SH-W (<i>H'</i>)	2.05	1.64	1.65	1.29	0.50	0.29	0.33	0.41	0.08	0.19	0.14	1.88	1.74	1.67	0.53	0.42	0.51	0.52	0.51	0.08	0.14	0.00
SIMP (<i>D</i>)	0.68	0.55	0.59	0.51	0.20	0.10	0.11	0.13	0.02	0.06	0.04	0.64	0.64	0.63	0.11	0.12	0.15	0.13	0.15	0.02	0.04	0.00

^a(%)

Table 2: Frequency of yeast species occurrence (%) isolated during spontaneous white wine Sauvignon fermentation.

Yeast species	SAUVIGNON BLANC (Sg)																					
	ORGANIC (SgO)											INTEGRATED (SgI)										
	Day of fermentation (sampling day)																					
	1	3	7	9	11	14	16	18	21	23	25	1	3	7	9	11	14	16	18	21	23	25
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	53 ^a	37	42	9								73	55	14	10							
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	2											10										
<i>Pichia cecembensis</i>	5	5	1	4	2	3	2	4	1				5	2	5	2			1	1		
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>												6										
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			29	64	79	89	88	87	97	100	100		12	50	76	88	93	98	97	96	99	100
<i>Pichia fermentans</i>	4	6	2	3			1					11	18	28	6	4	4					
<i>Candida ethanolica</i>	11	10	1	5	8	5	4	3	2													
<i>Pichia membranifaciens</i>	11	29	15	7	4			1					10	6	3	6	3	2	2	3	1	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	14	13	10	8	7	3	5	5														
No. of different species	7	6	7	7	5	4	5	5	3	1	1	4	5	5	5	4	3	2	3	3	2	1
SH-W (<i>H'</i>)	2.10	2.22	2.03	1.84	1.13	0.67	0.68	0.79	0.22	0.00	0.00	1.26	1.84	1.77	1.24	0.70	0.43	0.14	0.22	0.27	0.08	0.00
SIMP (<i>D</i>)	0.67	0.75	0.71	0.57	0.36	0.20	0.22	0.24	0.06	0.00	0.00	0.44	0.64	0.65	0.41	0.22	0.13	0.04	0.06	0.08	0.02	0.00

^a(%)

PŘÍLOHA 3

Identification of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Moravian wines and screening of their oenological properties for their potential application as the starter culture

Hana Šuranská, Dana Vránová, Jiřina Omelková

(v oponentním řízení)

Folia Microbiologica

Identification of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Moravian wines and screening of their oenological properties for their potential application as the starter culture

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:

FOLM-D-13-00330

Identification of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Moravian wines and screening of their oenological properties for their potential application as the starter culture

^aHana Šuranská, ^aDana Vránová, ^aJiřina Omelková

^a*Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Food Science and Biotechnology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic*

Key words

Saccharomyces genus; oenological properties; ITS-RFLP; interdelta PCR typing; species-specific primers

Abstract

In the present work we isolated and identified various indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and screened them for the selected oenological properties. These *S. cerevisiae* strains were isolated from berries and spontaneously fermented musts. The grape berries (Sauvignon blanc and Pinot noir) were grown under the integrated and organic mode of farming in South Moravia (Czech Republic) wine region. Modern identification techniques such as PCR-fingerprinting including RAPD PCR and rep-PCR by M13 primer; species-specific primers and interdelta PCR typing were employed to differentiate among indigenous *S. cerevisiae* strains. This combination of the methods provides rapid and relatively simple approach for identification of yeast of *S. cerevisiae* at strain level. In total, 120 isolates were identified and grouped by molecular approaches and 45 of representative strains were tested for selected important oenological properties including ethanol, sulphur dioxide and osmotic stress tolerance, intensity of flocculation, desirable enzymatic activities and their ability to produce and utilize acetic/malic acid was examined as well. Further, H₂S production as an undesirable property was screened. The oenological characteristics of indigenous isolates were compared to commercially available *S. cerevisiae* BS6 strain which is commonly used by the small Moravian winery as the starter culture. Finally, some indigenous strains coming from organically treated grape berries were chosen for their promising oenological properties and these strains will be used as the starter culture, because application of selected indigenous *S. cerevisiae* strain can enhance regional character of traditional Moravian wines.

Introduction

The quality of fermented foods and beverages is partially determined by the microorganisms used in their production. The secondary character of wine is determined by sensory characteristics that arise from the direct action of microorganisms on the substrate. The fermentation of grape must into wine is ecologically complex process, in which bacteria and other microorganisms, especially yeasts, play crucial role. The strains of *Saccharomyces cerevisiae* involved in fermentation play an important

part in the characteristics of the final product and the diversity of *S. cerevisiae* strains present in spontaneous fermentation contribute to the chemical composition and sensory qualities of the resulting wine (Le Jeune et al. 2006).

Therefore, one of the most important technological advances in wine-making was the inoculation of grape juice with selected cultures of *S. cerevisiae* (Ciani and Comitini 2011). This approach is based on the evidence that microbiological control of the fermentation process allows better management of this alcoholic fermentation. It is known that selected strains of *S. cerevisiae* suppress any indigenous non-*Saccharomyces* species and dominate the fermentation process (Ranieri and Pretorius 2000; Fleet 2008; Comitini et al. 2011).

Nowadays, novel biotechnological approaches in winemaking are used in several aspects of the fermentation industry. Apart from the monitoring of the microbial populations and the control of the spoilage yeasts, the attention is focused also on the selection and utilization of the starter cultures coming from own vineyard, which can enhance regional character of the wine (Pretorius 2000; Suárez-Lepe and Morara 2012). The metabolic peculiarities and the physiological properties of particular *S. cerevisiae* yeast may lead to the formation of metabolites and the transformation of grape substances that may enrich the wine flavor (Suárez-Lepe and Morara 2012). Certain criteria need to be met in order to guarantee the desirable features of the yeast strains selected. The most important are: tolerance to ethanol; growth at high sugar concentrations; resistance to sulfur dioxide; low production of hydrogen sulfide; resistance to killer toxin or some enzymatic activities (Nikolaou 2006).

Furthermore, only reliable and rapid identification of the yeast species during process and the quality control enables enologists to assess the role of yeasts as a main protagonist of alcoholic fermentation or as a contaminant. The utilization of molecular methods enabled rapid and precise identification of the yeasts at the species or strain level (Le Jeune et al. 2006). Mercado et al. (2010) reported that *Saccharomyces* populations are integrated by multiple strains, even in inoculated

fermentations. Therefore, it is important to have simple and appropriate methods that allow discrimination at the strain level.

This study is focused on indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strain (i) selection, (ii) identification and (iii) technological characterization. Yeasts were isolated from grapes and musts during the production of Moravian wines. We selected two types of wine varieties – Sauvignon blanc and Pinot noir coming from organic and integrated treated vineyard situated in South Moravia, Czech Republic. Our objective was also focused on the selection of the identification approaches which will be simple and suitable for rapid and reliable strain identification. Therefore, isolates of *S. cerevisiae* were identified and grouped by several molecular approaches such as ITS-RFLP, PCR-fingerprinting, species-specific primers and interdelta PCR typing. Combination of these techniques enabled us rapid detection and identification of different *S. cerevisiae* strains. Finally, the isolated strains were screened for selected technological properties important in winemaking process and for further application as the starter cultures. To sum up, this study has demonstrated importance of selection of appropriate and rapid identification technique and also determination of some important oenological properties.

Methods

Yeast species isolation and cultivation

Autochthonous (indigenous) strains belonging to *Saccharomyces* genus were isolated from grape berries and also from spontaneously fermented musts in different stages of fermentation process during the vintage 2009 – 2011. The fermentation process was performed in the cellar which was separated from common fermentations of commercial wine production. Grapes were collected in vineyard situated in South Moravia region, Czech Republic. Pinot Noir (Pn) and Sauvignon blanc (Sg) cultivars of *Vitis vinifera* cultivated under the organic (O) and also integrated (I) farming procedure were used.

Grape berries were collected to the sterile glasses and approximately 15 – 20 berries were placed into 150 mL of Malt extract medium MEM (Brewery Starobrno, Czech Republic) and cultivated for 10 days at laboratory temperature. After that, culture media (300 µl) were inoculated onto Petri dishes and incubated at 26 °C for 3 – 5 days.

Yeast populations from must were isolated as described previously (Šuranská et al. 2012) and cultivated on malt extract medium (MEM) supplemented with 250 mg·L⁻¹ streptomycin sulphate (Himedia, India). The single colonies (pure culture) were obtained by Koch's dilution method.

In total, 120 *Saccharomyces* sp. strains were isolated and identified. Pure cultures were preserved on MEM agar under the paraffin oil.

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from single colonies by commercial kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, USA) according to the manufacture's protocol.

ITS-PCR-RFLP

To distinguish *Saccharomyces* sp. from other isolates, ITS-PCR-RFLP was employed. The internal transcribed spacers (ITS) (ITS1 and ITS2) and 5.8S rDNA gene regions were amplified by using specific primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). DNA amplification was carried out in the final volume of 50 µL containing 0.2 mM of dNTP, 0.5 µL of each primer 100 pmol µL⁻¹, 1 × PCR reaction buffer and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Kapa Biosystems, USA). PCR conditions were as follows: initial denaturation cycle at 94 °C for 4 min followed by 25 cycles of amplification, denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 48 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min; final extension at 72 °C for 10 min.

For RFLP, PCR products were purified by ethanol precipitation and digested by restriction endonucleases *Hae*III (Fermentas, USA) following the manufacturer's instructions.

Species-specific primers

For *Saccharomyces cerevisiae* species identification, set of pairs of species-specific primers ScerF2 (5'-GCGCTTTACATTCAGATCCCGAG-3') and ScerR2 (5'-TAAGTTGGTTGTCAGCAAGATTG-3') were used (Muir et al., 2011). DNA amplification was carried out in a final volume of 25 μ l containing 0.2 mM of dNTP (Invitex, Germany), 200 nM of each primer (100 μ M) (VBC Biotech, Germany), 1 \times PCR reaction buffer, 1.5 mM MgCl₂ and 1.25 U *Taq* DNA polymerase (BioRad, USA) and 0.5 μ l of template DNA. PCR cycling conditions used were: initial denaturation cycle at 94 °C for 4 minutes followed by 30 cycles of amplification, denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min; final extension at 72 °C for 2 min.

PCR-fingerprinting and interdelta PCR typing

In order to distinguish different *Saccharomyces cerevisiae* strains, PCR-fingerprinting by using M13 primer and interdelta PCR were used. DNA amplification was carried out in a final volume of 25 μ l containing 0.2 mM of dNTP (Invitex, Germany), 200nM of each primer (100 μ M) (VBC Biotech, Germany), 1 \times PCR reaction buffer and 1 U *Taq* DNA polymerase (Kapa, USA) and 0.5 μ l of template DNA.

PCR-assays for *rep-PCR* by using random primer M13: initial denaturation cycle at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of amplification followed by denaturation at 93°C for 0.75 s, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min; final extension at 72°C for 6 min.

PCR-assays for *RAPD-PCR* by using random primer M13: initial denaturation cycle at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles of amplification followed by denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 36°C for 45 s, and extension at 72°C for 45 s; final extension at 72°C for 7 min.

The conditions for *interdelta PCR typing* by δ 1 (5'-CAAATTCACCTATATTCTCA-3') and δ 2 (5'-GTGGATTTTTATTCCAACA-3'); δ 2 (5'-GTGGATTTTTATTCCAACA-3') and δ 12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') were as follows: initial denaturation cycle at 94 °C for 4 minutes, followed by 30 cycles of amplification – denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 49 °C for 1 min and extension at 72 °C for 2 min. The final extension was at 72 °C for 10 minutes.

Detection of PCR products

PCR products and restriction fragments were separated and detected by electrophoresis on 2% (w/v) agarose gel in $1 \times$ TBE buffer at $5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ for 2 hours. DNA amplified by single repetitive primers and by delta primers were separated on 1.5% agarose gel for 3 – 4 hours. The gels were stained by ethidium bromide ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), visualized under UV light (Ultra Lum. INC, USA) and documented by ScionImage software (Scion, India). Finally, electrophoreograms were processed by the BioNumerics 6.5 software employing UPGMA cluster analysis.

Screening of oenological properties

Some important technological properties such as intensity of flocculation; ethanol, SO_2 and osmotic stress were tested. Further, selected properties including some enzymatic activities, ability to produce and utilize acetic/malic acid were examined. Also H_2S production as an undesirable property was screened. For utilization and production tests – the plates were incubated at $26 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 days.

To test flocculation properties, yeasts were cultured for 3 days at $26 \text{ }^\circ\text{C}$ in tubes containing 10 mL of YPD (2% peptone, 1% yeast extract and 2% glucose) medium under permanent shaking (150 rpm). Cells were collected by centrifugation and washed with deionized water. After that, cells were suspended into 10 mL of 50 mM acetate buffer (pH 4.5) enriched by 3 mM CaSO_4 . The tubes of suspended cells were mixed for 30 s and the turbidity of yeast suspension was evaluated by naked eye. Flocculation degree was determined using a subjective scale.

Ethanol tolerance was tested in 5 mL of YPD medium supplemented by 12, 14, 15, 16 and 17% (v/v) ethanol and the tubes were inoculated by 100 μL of cell suspension (cell concentration approx. $5 \text{ log CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$). Inoculated tubes were cultivated at $26 \text{ }^\circ\text{C}$ for 10 days. The culture density was measured daily by DEN-1B densitometer (Biosan, Latvia). Specific growth rate μ (h^{-1}) and the length of the lag phase t (h) were estimated.

Osmotolerance of selected strains was tested in 5 mL of YPD medium with 40% and 50% glucose. The cells density was measured as described above.

The H₂S production was evaluated on Biggy agar (Himedia, India). On this medium, the H₂S-negative strains show white colonies while the H₂S-producing colonies are brown or dark brown in color. The following arbitrary scale was used: – no production; + white colonies; ++ light brown; +++ brown; ++++ dark brown/black. The plates were incubated at 26 °C for 3 days.

Malic acid and acetic acid utilization was tested on 0.67% yeast nitrogen base (YNB, Himedia) agar (2%) plate containing 0.5 % (w/v) of malic acid respective 0.25.

Acetic acid production was screened on CaCO₃ agar plates (Custer's chalk medium) containing 0.5% yeast extract, 5% glucose, 0.5% CaCO₃ and 2% agar. The acetic acid production by cells was evaluated as a clear zone surrounding the colonies.

The isolated yeasts were also tested for some enzymatic activities such as β -glucosidase and glycosidase activities. The activities were determined by agar plating. The plates were incubated at 26 °C for 3 to 5 days.

Further, *β -glucosidase* activity was screened onto selective medium containing 0.67% yeast nitrogen base (YNB, Himedia), 0.5% arbutin and 2% agar. The pH of the medium was adjusted to 5 before autoclaving. Two milliliters of a filter sterilized 1% ferric ammonium citrate solution was added to 100 mL media before plates pouring. Colonies showing activity were identified by dark brown halo around the colonies (Stauss et al. 2001).

Glycosidase activity was determined using the plates with the selective medium containing 0.67% yeast nitrogen base (YNB, Himedia), 0.2% of rutin and 2% agar. The glycosidase activity was detected as a clear zone around the colonies (Stauss et al. 2001; Comitini et al. 2011).

Results and discussion

Selection and identification of Saccharomyces cerevisiae strains

In total, we isolated 120 single colonies of autochthonous *Saccharomyces* sp. strains. Yeasts were isolated from Sauvignon blanc (Sg) and Pinot noir (Pn) coming from organic (O) and integrated (I) farming. The yeast species were isolated from grape berries as well as from spontaneously fermented must during the vintage 2009 (09), 2010 (10) and 2011 (11). The list of the isolates and the sources of their isolation are shown in Table 1.

Yeasts of the genus *Saccharomyces* were distinguished from the other isolates (from non-*Saccharomyces* species) by ITS-RFLP (the length of PCR amplicon was 880 bp). Further, for *Saccharomyces cerevisiae* species identification we employed species-specific primers ScerF2 and ScerR2 (Muir et al. 2011). Based on our results, all the isolates belonging to *Saccharomyces* genus were identified by species-specific primers as *S. cerevisiae* (the length of the PCR products was 150 bp) (data not shown).

Further, RAPD and rep-PCR by using random M13 primer were used. The isolates were divided into 3 groups by rep-PCR and 4 groups by RAPD. Data are presented as the part of the dendrogram (Figure 1). Two isolates (marked as U, T) exhibited different fingerprinting profile than the rest of the isolates; these isolates may be hybrids of *S. cerevisiae* and another species belonging to *Saccharomyces* genus. Hence, PCR-fingerprinting techniques using M13 primer are able to group the species members of *Saccharomyces* genus but they are not suitable for different strains separation.

In order to distinguish various *S. cerevisiae* strains, we employed $\delta 1$ - $\delta 2$ and $\delta 12$ - $\delta 2$ primers amplifying inter-delta sequences. These delta elements are described as appropriate genetic markers for identification of polymorphisms because the number and location have a certain intraspecific variability (Franco-Duarte et al. 2011). The primer pair $\delta 1$ - $\delta 2$ generated from three to eight different fragments per strain with one common band of the size of approximately 1000 bp. On the other hand, primer pair $\delta 12$ - $\delta 2$ provided significantly more fragments per sample and some of them were of low intensity. The low number of fragments per sample is ascribed to the weak homology

exhibited by the primer $\delta 1$ - $\delta 2$ towards the whole sequence of *S. cerevisiae* genom (Xufre et al. 2011). However, by combination of these two set of delta primers, we identified 45 different *S. cerevisiae* strains. Majority of the isolated and identified *S. cerevisiae* strains came from spontaneous fermented musts and belonged to group A (strain A). Further, some authors (Fleet et al. 2002; Raspor et al. 2006) reported that it is almost impossible to isolate *Saccharomyces* sp. populations from berries and initial must by standard direct agar plating procedure due to their low counts ($> 10 - 100$ CFU·cm⁻²). However, we isolated three strains from grape berries (see Table 1). The electrophoretic patterns and final dendrogram showing the genetics similarity of various identified *S. cerevisiae* strains are shown in Figure 1.

The combination of the modern molecular approaches used in this study for strain identification seems to be suitable for rapid, reliable, simple and reproducible identification of *S. cerevisiae* strains. Recent studies (Schuller et al. 2004; Maqueda et al. 2010; Ortiz et al. 2013) reported application of mitochondrial DNA restriction analysis or karyotyping in order to distinguish various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. However, these methods are labor intensive and the results are influenced by complexity of data interpretation due to high number of generated fragments after mtDNA RFLP. On the contrary, we employed different approaches to group and distinguish *Saccharomyces* at strain level based on consequent employment of PCR-fingerprinting. For instance Schuller et al. (2004) reported that interdelta PCR typing had very similar resolving power at strain level as mtDNA and karyotyping, therefore, the combination of the methods utilized in this work can be considered as simple and rapid alternative to mtDNA or karyotyping.

Screening of selected oenological properties of various Saccharomyces cerevisiae strains

Because not all yeast strains are relevant for the specific conditions and characteristics of wine, a number of criteria have been proposed for the selection of new yeast strains for use in winemaking process. One of the most important criterions for high-quality wine production is using of *S. cerevisiae* strain with suitable technological properties. Thus, in order to investigate phenotypic

differences among 45 indigenous *S. cerevisiae* strains we screened them for the selected technological properties. Strain *S. cerevisiae* BS6, which is commercially available, was used as a control. The complete list of results, summarizing oenological properties which are important for strain selection and their application in winemaking process, is provided in Table 2. The use of local, autochthonous, selected strain of *S. cerevisiae* as starters is rather preferable, since these yeasts are better acclimated to micro-area conditions of the wine production (Nikolaou et al. 2006) and, moreover, utilization of the local isolate of *S. cerevisiae* is likely to raise regional character of the wine.

Barrajón et al. 2011 reported that high fermentation power is obviously related to the capacity of the strain to overcome the stress associated with wine fermentation. For this purpose, we tested osmotic and ethanol stress tolerance.

The major target of ethanol is the membrane, altering the membrane organization and permeability and consequently inhibiting glucose transport and fermentation rate under enological conditions (Tofalo et al. 2009). As expected, the physiological differences among the stress tolerant species *S. cerevisiae* depended on the strain. The growth parameters of all the tested strains including specific growth rate and length of the lag phase are listed in Table 2. Eighteen isolated strains revealed better growth characteristics than control strain BS6 in the presence of 12% ethanol and 29 showed higher growth rate when exposed to 14% ethanol. Further, four isolated strains (W, X1, 2-09, 1-09) were able to grow in 16% ethanol but none of the tested strains was able to grow in the presence of 17% ethanol.

Higher sugar content of the grape must can result in an inhibition of the yeast metabolism and, therefore, to sluggish fermentation (Ortiz et al. 2013). Therefore, tolerance towards osmotic pressure is desirable property of the yeast starter culture. All the isolated strains were capable of growing in the presence of 40% and 50% glucose. Four strains (W1, X, L and 1-09) exhibited higher growth rate than the control strain BS6 in the presence of 40% glucose. Interestingly, despite the fact that Tofalo et al. (2009) did not notice any growth of *S. cerevisiae* strains in the presence of 50% glucose, most of

our isolates were capable of growing when cultivated in presence of 50%. Moreover, majority of the screened strains revealed on 50% glucose higher grow rate than the control strain.

Results of flocculation tests showed that, as also reported in other studies (Úbeda et al. 1998; Ortiz et al. 2013), most of the strains (91 %) remained in suspension after 10 minutes at rest. This is an important feature when selecting active dried yeasts for vinification, where yeast should ideally remain in suspension during fermentation (Ortiz et al. 2013).

Enzymes play a definitive role in the production of wine. The enzymatic activities do not only originate from the grapes itself, but also from yeasts and other microorganisms (Strauss et al. 2001). Based on our results, tested strains lacked β -glucosidase activity. Unlike the other authors (Delcroix et al. 1994; Comitini et al. 2011), we did not detect any glycosidase production by *S. cerevisiae* strains tested.

As reported by Suárez-Lepe and Morata (2012), yeasts might be selected for their ability to produce and degrade acetic and malic acid. Our results showed that 91 % (98 %) of our isolates were able to grow on the agar medium containing malic or acetic acid as a sole carbon sources. On the contrary, acetic acid production was observed for 29 % of tested strains.

Hydrogen sulphite has negative organoleptic impact on wine due to formation of off-flavours (Suárez-Lepe and Morata 2012). Fifteen isolates (29 %) synthesized H₂S and remaining strains exhibited only low H₂S production. Only one strain (B) did not produce H₂S, however, this strain is not suitable for application as a starter culture due to strong flocculation properties.

Yeast selection offers the best way to obtain strains of *S. cerevisiae* or other oenological species with properties that might improve the sensorial profile, technological properties or regional character of the wine (Suárez-Lepe and Morata 2012). The assays to determine yeast properties which could influence fermentative capacity and the ability to adapt to stressful conditions related to wine-production process revealed differences for some strains. Some indigenous strains exhibited better adaption to stressful conditions than control strain. On the contrary, some of them produced high amount of hydrogen sulphite causing off-flavour. Thus, if we compare all the tested strains, only

15 (A, A4, F, F1, I, J, L, M, R, S, X1, Z, 1-09, 2-09, 27-10) of them are suitable for further testing as starter cultures.

Finally, we choose strains 1-09, L and A isolated from berries coming from small winery situated in South Moravia wine region as a starter culture. This yeast was isolated from grapes which are natural origin of wine yeast. Based on our results, these strains show proper technological properties which are very similar to the control *S. cerevisiae* BS6 strain. Hence, some strains 1-09, L, A and strain 2-09 (isolated from must) will be used and tested in large-scale fermentation process by wineries in South Moravia region.

Conclusions

The present study demonstrated application of appropriate modern molecular techniques which are suitable for rapid *Saccharomyces cerevisiae* strain identification and further testing of various strains for their technological potential. The combination of used modern molecular techniques including species-specific primers, and interdelta PCR typing enabled us to identify *S. cerevisiae* at strain level. Also important physiological characteristics of the yeasts used in this study are suitable for rapid selection of the different *S. cerevisiae* strains which can be applied in winemaking process. Application of the selected strains with suitable technological properties in wine fermentation process should increase quality of the wine and enhance the regional character of traditional Moravian wines. Hence, some isolated indigenous strains will be tested in large-scale fermentation process by small Moravian winery.

Acknowledgment

This work was supported by a project of MŠMT ČR (Grant No. MSM 0021630501) and by a Standard project of specific research No.FCH-S-13-1912.

References

- Barrajón N, Arévalo-Villena M, Úbeda J, Briones A (2011). Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 2703-2710. Doi: 10.1007/s11274-011-0744-0.
- Ciani M, Comitini F (2011). Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann Microbiol* 61: 25-32. Doi: 10.1007/s13213-010-0069-5.
- Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 28:873-882. doi:10.1016.j.fm.2010.12.001.
- Delcroix A, Gunata Z, Sapis J, Salmon J, Bayonove C (1994). Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: Effect on the terpenol content of Muscat wine. *Am J Enol Viticult* 45: 291-296.
- Fleet GH, Prakitchaiwattana C, Beh AL, Heard GM (2002). The yeast ecology of wine grapes. In: Ciani M (Ed), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Research Singpost, Kerala, India, pp. 1-17.
- Fleet GH (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* 8: 979-995. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x
- Franco-Duarte R, Mendes I, Gomes AC, Santos MAS, de Sousa B, Schuller D (2011). Genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains by Interdelta sequence typing using automated microfluids. *Electrophoresis* 32: 1447-1455. Doi: 10.1002/elps.201000640.
- Le Jeune Ch, Erny C, Demuyter C, Lollier D (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol* 23: 709-716. Doi:10.1016/j.fm.2006.02.007.
- Maqueda M, Zamora E, Rodriguez-Cousino N, Raminez M (2010). Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiol* 27: 205-209. Doi: 10.1016/j.fm.2009.10.004.

- Mercado L, Jubany S, Gaggero C, Masuelli RW, Combina M (2010). Molecular relationships between *Saccharomyces cerevisiae* strains involved in winemaking from Mendoza, Argentina. *Curr Microbiol* 61: 506-514. Doi:10.1007/s00284-010-9645-y.
- Muir A, Harrison E, Wheals A (2011). A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Res* 11: 552-563.
- Nikolaou E, Soufleros EH, Bouloumpasi E, Tzanetakis N (2006). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiol* 23: 205-211. doi:10.1016/j.fm.2005.03.004.
- Ortiz MJ, Barrajón N, Baffi MA, Arévalo-Villena M, Briones A (2013). Spontaneous must fermentation: Identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT – Food science and technology* 50: 371-377.
- Pretorius IS (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 675-729.
- Ranieri S, Pretorius IS (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* 50: 15-31.
- Raspor P, Miklič Milek D, Polanc J, SmoleMožina S, Čadež N (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int J Food Microbiol* 109: 97-102. Doi:10.1013/j.ijfoodmicro.2006.01.017.
- Schuller D, Valero E, Dequin S, Casal M (2004). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol Lett* 231: 19-26. Doi: 10.1016/S0378-1097(03)00928-5.
- Strauss MLA, Jolly NP, Lambrechts MG, van Rensburg P (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J App Microbiol* 91: 182-190.
- Suárez-Lepe JA, Morara A (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends in Food Science & Technology* 23: 39-50. Doi:10.1016/j.tifs.2011.08.005.

- Šuranská H, Vránová D, Omelková J, Vadkertiová R (2012). Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine. Chem Pap 66: 861-868. DOI: 10.2478/s11696-012-0198-3.
- Tofalo R, Chaves-López C, Di Fabio F, Schirone M, Felis EG, Torriani S, Paparella A, Suzzi G (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. Int J Food Microbiol 130: 179-187. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.024.
- Úbeda, JF, Briones AI, Izquierdo, PM (1998). Study of oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. Food Microbiol 15: 399 – 406. Doi: 10.1006/fmic.1998.0183.
- Xufre A, Albergaria H, Gírio F, Spencer-Martins I (2011). Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. J Ind Microbiol Biotechnol 38: 127-132. Doi: 10.1007/s10295-010-0837-z.

Table 1: Number of *Saccharomyces sp.* isolates.

Grape variety	Vintage	Number of <i>Saccharomyces sp.</i> isolates	
		Integrated (I)	Organic (O)
		Grapes (B) /Must (M)	Grapes (B) /Must (M)
Sauvignon blanc (Sg)	2009	1/14	1/11
Pinot noir (Pn)	2010	0/14	0/17
Sauvignon blanc (Sg)	2011	0/20	0/17
Pinot noir (Pn)	2011	1/14	0/10
Total		120	

Figure 1: Dendrogram based on the similarity of PCR-fingerprinting patterns of *S. cerevisiae* isolates. *S. cerevisiae* BS6 – control strain. The description on the right side of the dendrogram is the label of the isolated *S. cerevisiae* strains.

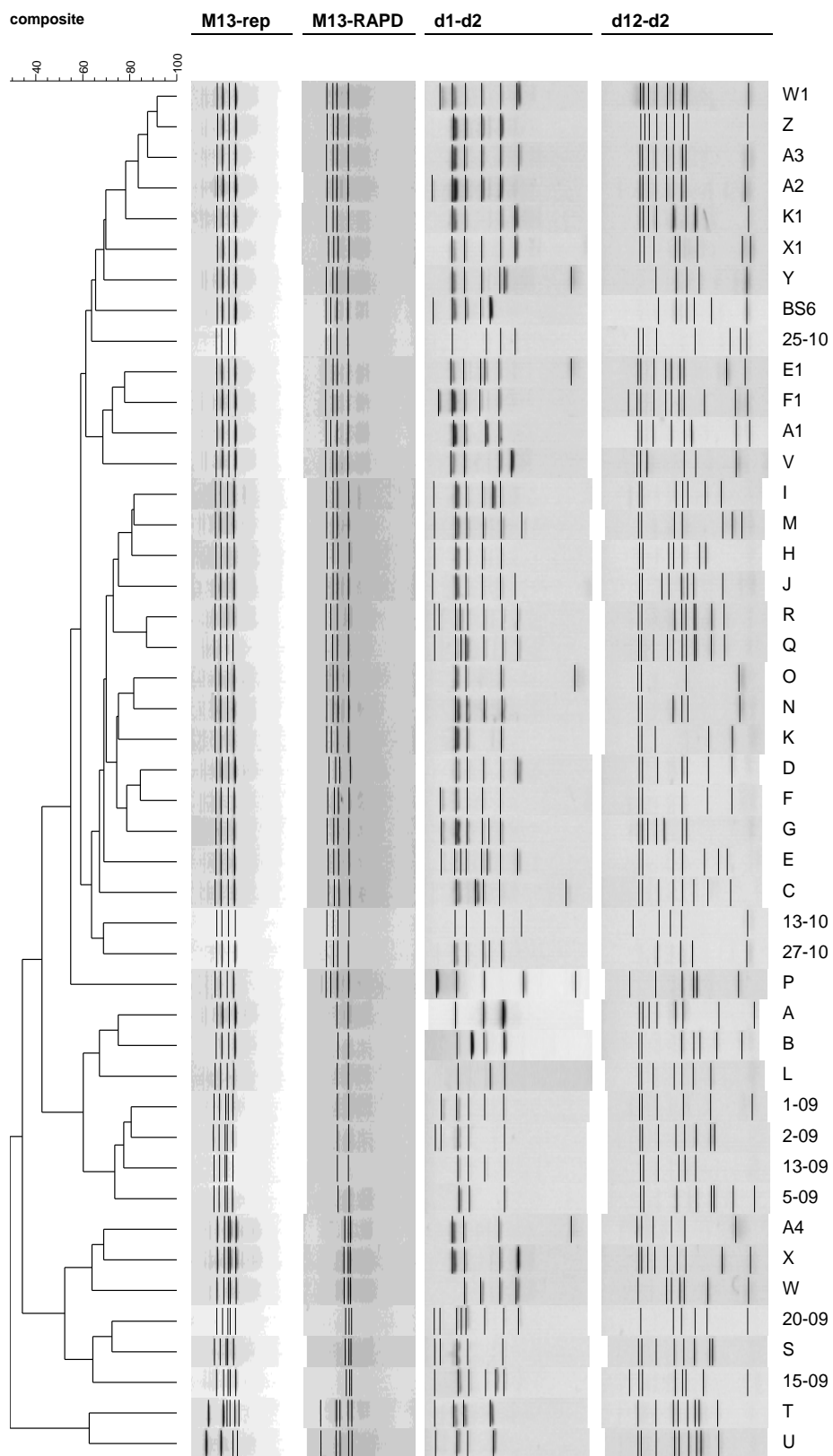


Table 2: Oenological properties of different indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and one commercial *S. cerevisiae* strain BS6 as a control. Pn – Pinot Noir; O, I – organic, integrated; M, B – must, grape berries; 09–11 – mean year of isolation (2009 – 2011). The grey labelled fields – the strains which physiological properties were better than control strain BS6.

		DESIRABLE TECHNOLOGICAL PROPERTIES															UNDESIRABLE PROPERTIES			
Isolated strain	Source of isolation	Ethanol resistance (%)					Osmotolerance													
		12% ethanol		14% ethanol		Ethanol (%)			40% glucose		50% glucose		SO ₂ tolerance	MA utilization		AA utilization	AA production	Glycosidase activity	Flocculation	H ₂ S production
		μ (h ⁻¹)*	lag phase t (h)	μ (h ⁻¹)*	lag phase t (h)	15	16	17	μ (h ⁻¹)*	lag phase t (h)	μ (h ⁻¹)*	lag phase t (h)		0.5%	0.25%					
A	PnIB-11	0.061	22	0.019	58	+	-	-	0.037	19	0.029	24	+	+	+	w	-	+	++	
A1	SgOM-11	0.054	22	-	-	-	-	-	0.044	19	0.029	24	+	+	+	w	-	+	++	
A2	PnOM-11	0.058	24	0.025	59	+	-	-	0.049	19	0.021	24	+	+	+	+	-	+	+++	
A3	PnIM-11	0.055	24	-	-	-	-	-	0.037	28	0.013	24	+	+	+	+	-	+	++	
A4	SgIM-11	0.092	24	0.017	39	-	-	-	0.052	19	0.022	24	+	+	+	+	-	+	++	
B	PnOM-10	0.060	24	0.028	85	-	-	-	0.055	19	0.023	30	+	w	w	w	-	++++	-	
C	SgOM-09	0.060	24	0.033	58	-	-	-	0.057	19	0.020	24	+	w	+	+	-	+	+++	
D	PnOM-10	0.075	24	0.018	42	-	-	-	0.054	19	0.014	24	+	+	+	w	-	+	+++	
E	PnIM-10	0.080	22	0.013	42	-	-	-	0.051	19	0.020	43	+	+	+	w	-	+	++++	
E1	SgOM-11	0.057	24	0.033	80	-	-	-	0.051	19	0.020	24	+	+	+	+	-	+	++++	
F	SgOM-09	0.097	24	0.019	42	-	-	-	0.059	19	0.021	35	+	+	+	+	-	+	+	
F1	SgIM-11	0.073	16	0.017	43	-	-	-	0.051	19	0.020	24	+	+	+	w	-	+	++	
G	PnOM-10	0.058	24	0.018	45	-	-	-	0.065	19	0.021	28	+	+	+	w	-	+	++++	
H	SgIM-09	0.056	22	0.014	42	+	-	-	0.064	19	0.025	67	+	+	+	+	-	w	++++	
I	SgOM-09	0.090	22	0.063	24	-	-	-	0.052	19	0.019	51	+	+	+	++	-	+	++	
J	PnOM-10	0.055	24	0.046	24	-	-	-	0.058	19	0.024	52	+	+	+	++	-	+	++	
K	PnIM-10	0.061	14	0.034	68	-	-	-	0.060	19	0.016	43	+	w	+	++	-	+	++	
K1	PnIM-11	0.065	24	0.032	68	-	-	-	0.060	24	0.022	45	+	w	+	w	-	+	++	
L	SgIB-09	0.071	22	0.018	40	-	-	-	0.071	19	0.019	43	+	+	+	w	-	+	++	
M	PnOM-10	0.061	14	0.017	40	+	w	-	0.051	19	0.023	51	+	+	+	++	-	+	+	
N	PnIM-10	0.068	20	0.023	58	-	-	-	0.055	19	0.022	45	+	+	+	w	-	+	++++	
O	PnIM-10	0.055	20	0.005	150	-	-	-	0.061	19	0.028	67	+	+	+	w	-	+	++++	

P	PnOM-10	0.080	24	0.028	50	-	-	-	0.068	24	0.020	51	+	+	+	w	-	+	+
Q	SgOM-09	0.078	24	0.014	42	-	-	-	0.061	19	0.012	43	+	+	+	-	-	+	+
R	SgIM-09	0.060	24	0.013	24	-	-	-	0.062	19	0.018	43	+	+	+	w	-	+	+
S	SgIM-09	0.063	24	0.011	25	+	-	-	0.064	19	0.017	43	+	+	+	+	-	+	+
T	SgIM-09	0.070	24	0.010	24	+	w	-	0.065	19	0.017	43	+	+	+	-	-	+	++
U	SgIM-09	0.062	22	0.013	42	-	-	-	0.057	24	0.020	35	+	+	+	-	-	+	++
V	SgOM-11	0.049	4	0.010	38	-	-	-	0.064	19	0.022	51	+	+	+	-	-	+	++
W	SgIM-11	0.060	20	0.013	24	+	+	-	0.062	19	0.020	43	+	+	+	-	-	+	+
W1	PnIM-11	0.076	14	0.016	38	-	-	-	0.077	19	0.020	43	+	+	+	-	-	+	++++
X	SgIM-11	0.064	24	0.018	42	-	-	-	0.072	19	0.022	43	+	+	+	-	-	+	+
X1	PnOM-11	0.075	25	0.016	25	+	+	-	0.064	19	0.018	51	+	+	+	w	-	+	+
Y	SgOM-11	0.073	22	0.006	24	-	-	-	0.065	19	0.022	67	+	+	+	w	-	+	+
Z	PnOM-11	0.064	16	0.007	24	-	-	-	0.058	19	0.018	43	+	+	+	+	-	+	+
1-09	SgOB-09	0.067	22	0.009	24	+	+	-	0.071	19	0.021	52	+	+	+	w	-	+	+
2-09	SgIM-09	0.058	24	0.011	40	+	+	-	0.064	19	0.016	55	+	+	+	w	-	+	+
5-09	SgIM-09	0.062	22	0.010	42	-	-	-	0.065	19	0.024	46	+	+	+	-	-	+	++++
13-09	SgOM-09	0.058	16	0.008	24	-	-	-	0.063	19	0.021	51	+	+	+	-	-	w	++
15-09	SgOM-09	0.067	22	0.013	24	-	-	-	0.069	24	0.020	46	+	+	+	-	-	+	++++
20-09	SgOM-09	0.059	22	0.006	26	+	w	-	0.062	19	0.019	46	+	+	+	-	-	+	+
13-10	PnOM-10	0.062	20	0.009	40	-	-	-	0.060	19	0.020	60	+	+	+	-	-	w	+++
27-10	PnIM-10	0.065	24	0.003	80	-	-	-	0.065	19	0.021	44	+	+	+	-	-	+	++
25-10	PnIM-10	0.063	20	0.014	42	-	-	-	0.060	19	0.020	26	+	+	+	-	-	+	++
BS6	control	0.064	20	0.012	24	-	-	-	0.070	24	0.018	26	+	+	+	-	-	+	++
	Positive (%)	100	-	96	-	24	9	-	100	-	100	-	100	91	98	29	-	91/2	9 ³ /20
	Weak (%)	-	-	4	-	-	7	-	-	-	-	-	-	9	2	38	-	7	31/38
	Negative (%)	-	-	-	-	76	84	100	-	-	-	-	-	-	0	33	100	-	2

Note: no glucosidase and glycosidase activities for all tested indigenous strains and also for commercial BS6 strain.

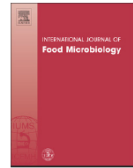
^astrong positive; for H₂S production: positive (+++ and ++++), weak (+ and ++). * Specific growth rate; the standard deviations were not higher than 20 %.

PŘÍLOHA 4

Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia

Nataša Golić, Neža Čadež, Amarela Terzić-Vidojević, Hana Šuranská, Jasna Beganović, Jelena Lozo, Blaženka Kos, Jagoda Šušković, Peter Raspor, Ljubiša Topisirović

International Journal of Food Microbiology, 2013



Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia

Nataša Golić^{a,*}, Neža Čadež^{b,1}, Amarela Terzić-Vidojević^a, Hana Šuranská^{b,2}, Jasna Beganović^{a,c}, Jelena Lozo^{a,b,d}, Blaženka Kos^c, Jagoda Šušković^c, Peter Raspor^b, Ljubiša Topisirović^a

^a Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

^b Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

^c Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

^d Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2013

Received in revised form 21 May 2013

Accepted 31 May 2013

Available online 24 June 2013

Keywords:

Artisanal cheese

Microbiota

Lactic acid bacteria

Yeast

ABSTRACT

The goal of this study was the characterisation of indigenous lactic acid bacteria (LAB) and yeasts isolated from nine white pickled (BG) and nine fresh soft (ZG) artisanal cheeses collected in Serbia and Croatia. While LAB were present in all of the cheeses collected, yeasts were found in all BG cheeses but only in three ZG cheese samples. High LAB and yeast species diversity was determined (average $H'_L = 0.4$ and $H'_Y = 0.8$, respectively). The predominant LAB species in white pickled (BG) cheeses were *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, and *Leuconostoc mesenteroides*, while in fresh soft (ZG) cheeses the most dominant LAB species were *L. lactis*, *Enterococcus faecalis*, and *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Among the 20 yeast species found, *Debaryomyces hansenii*, *Candida zeylanoides*, and *Torulaspora delbrueckii* were found to be predominant in BG cheeses, while *Yarrowia lipolytica* was predominant in ZG cheeses. The characterisation of metabolic and technological potentials revealed that 53.4% of LAB isolates produced antimicrobial compounds, 44.3% of LAB strains showed proteolytic activity, while most of the yeast species possessed either lipolytic or proteolytic activity. In conclusion, the results obtained in this study showed that the composition of LAB and yeast populations in white pickled and fresh soft cheeses is region specific. The knowledge gained in this study could eventually be used to select region specific LAB and yeast strains for the production of white pickled and fresh soft artisanal cheeses with geographically specific origins under controlled conditions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The Western Balkan Countries (WBC) constitute a distinct geographical region in Europe with long experience in the production of traditional dairy foods by spontaneous or controlled fermentation of cow's, ewe's and goat's milk. In this region, various spontaneously fermented dairy products, such as white pickled and fresh soft cheeses, are manufactured in households without the use of commercial starter

cultures. Most of these products are made from unpasteurised milk and the composition of the "natural starter" depends solely on the microbiota present in the raw milk or in the local environment. These microorganisms contribute to preservation, flavour, aroma and texture, determining unique product characteristics.

Preliminary characterisation of the dominant microbiota in these artisanal dairy products revealed that they contain a considerable diversity of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts. LAB isolated from autochthonous cheeses have considerable genetic, metabolic and technological potential: good milk protein coagulation, accelerated acidification, production of proteinases, exopolysaccharides, aroma and taste precursors, as well as health-promoting properties (Topisirović et al., 2006). The dominant LAB are represented by various lactobacillus species: leuconostocs, enterococci, *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* (Randazzo et al., 2002; Terzić-Vidojević et al., 2007; Nikolic et al., 2008; Jokovic et al., 2008; Čebeňová-Turcovská et al., 2011). Yeast species usually represent secondary microbiota in dairy products and among them *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* are usually found to be predominant (Frolich-Wyder, 2003;

Abbreviations: L, *Lactococcus*; Lb, *Lactobacillus*; Ln, *Leuconostoc*; E, *Enterococcus*; Strep, *Streptococcus*; Staph, *Staphylococcus*; D, *Debaryomyces*; C, *Candida*; T, *Torulaspora*; Y, *Yarrowia*; Tr, *Trichosporon*.

* Corresponding author at: Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Vojvode Stepe 444a, P. O. Box 23, 11010 Belgrade, Serbia. Tel.: +381 11 3975960; fax: +381 11 3975808.

E-mail address: natasag@imgge.bg.ac.rs (N. Golić).

URL: <http://www.imgge.bg.ac.rs/Eng/seeranet.htm> (N. Golić).

¹ Equally contributed.

² Permanent address: Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic.

0168-1605/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032>

Chebeňová-Turcovská et al., 2011). Moreover, recent studies have indicated that food borne yeasts *D. hansenii* and *Yarrowia lipolytica* could successfully be used as part of starter cultures for cheese manufacturing, enhancing flavour development during cheese maturation (Ferreira and Viljoen, 2003; Sørensen et al., 2011).

Considering the significant role of autochthonous microbiota in the determination of the main features of a cheese, the goal of this study was the identification and characterisation of LAB and yeasts associated with the production of artisanal white pickled and fresh soft cheeses traditionally performed in rural households in the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. To our knowledge, this is the most complete study highlighting the phenotypic and genotypic diversity of LAB and natural yeast isolates from traditional cheeses in Serbia and Croatia.

2. Material and methods

2.1. Cheese samples

The cheese sampling regions were chosen based on the history of traditional dairy product manufacturing from different kinds of raw milk without the addition of any starter culture. Nine white pickled artisanal cheeses (designated as BG) were collected from three regions in Serbia: the South Morava region (one-day-old BGAL2, two-day-old BGLE1, and 10-day-old BGAL3), Golija Mountain (10-day-old BGG05 and BGG011, and 60-day-old BGG07) and the mountainous region of Eastern Serbia (three-day-old BGVL1 and BGBU1, and 10-day-old BGRE2). Nine one-day-old fresh soft artisanal cheeses (designated as ZG) were collected from three regions in Croatia: Prigorje (ZGPR1, ZGPR2 and ZGPR3), the Bilogorsko-Podravska region (ZGBP4, ZGBP5, and ZGBP6) and Zagorje (ZGZA7, ZGZA8 and ZGZA9). The cheeses were taken from the households where they were originally produced. All samples were placed in sterile plastic containers that were transported to the laboratory immediately, under refrigeration. Microbiological analysis of each sample was performed within 24–48 h.

In general, white pickled cheeses manufactured in the rural regions of Serbia are characterised by a mild salty and sour taste; the curd has a soft consistency with a number of bigger or smaller cheese holes and a porcelain shine. Briefly, the cheeses are made from fresh milk by the addition of rennet. The curd forms after 1 to 2 h. After the whey forms, the curd is drained and then pressed with a weight for 2 h. The resulting pressed curd is cut into rectangular pieces, salted, and covered with brine containing 2% (w/v) NaCl. The cheese ripens from 1 to 60 days at 15–18 °C, kept permanently under the brine.

The traditional procedure of fresh soft cheese production in rural lowland regions of Croatia is carried in a similar fashion to that described above, although without the ripening and without the addition of salt and brine (Kirin, 2006; Leboš Pavunc et al., 2012). The cheese is kept in a cold place until consumption or sale.

2.2. Isolation and identification of lactic acid bacteria

LAB isolation from the cheese samples was performed essentially as described by Terzić-Vidojević et al. (2007). For microbiological analysis, 20 g of each sample was taken from the cheese interior, homogenized with a pestle in a sterile mortar, and transferred to 180 ml of sterile 2% (w/v) sodium citrate solution in a sterile conical flask. Decimal dilutions of the homogenates were prepared with sterile 0.85% (w/v) sodium chloride and were plated on the media most suitable for the isolation of each LAB: a) for presumptive lactobacilli, on MRS agar pH 5.7 (Merck GmbH, Darmstadt, Germany) at 30 °C and 45 °C for 72 h in aerobic conditions, and in anaerobic conditions in anaerobic jars with Anaerocult A (Merck, GmbH, Darmstadt, Germany) for 5 days; b) for presumptive lactococci on M17 agar pH 7.2 (Merck, GmbH, Darmstadt, Germany) at 30 °C for 72 h (Mannu et al., 2002).

Thirty to fifty colonies per sample were taken at random from both MRS (30 °C and 45 °C) and M17 (30 °C) agar plates corresponding to the highest dilution at which growth occurred. The cell morphology of all strains of LAB was determined by microscopy (Olympus U-RFL-T, BX51, GmbH, Hamburg, Germany). After microscopic observations, the colonies were sub-cultured to purity on an MRS or M17 plate, and stored at –80 °C in an appropriate medium (GM17 or MRS) supplemented by 15% (v/v) glycerol. Identification of LAB isolates based on their phenotypic characteristics and 16S rDNA sequencing, as well as rep-PCR analysis were performed as described previously (Veljović et al., 2007; Golić et al., 2012). The 16S rDNA region was sequenced (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands), by using primers UNI16SF and UNI16SR (Jovčić et al., 2009). Rep-PCR analysis was performed by using (GTG)₅ primers (Versalovic et al., 1994).

2.3. Isolation and identification of yeasts

For the isolation of yeasts, 10 g of each cheese was diluted in 90 ml of phosphate buffer solution and homogenized in a Stomacher blender for 60 s. Each cheese was sampled in triplicate. The cheese suspensions were serially diluted (10⁻¹ to 10⁻⁶) in sterile PBS. From each dilution 100 µl of suspension was transferred to YPD agar plates (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing 10 mg/ml of ampicillin (Roche, Mannheim, Germany). The plates were incubated at 26 °C for 3–5 days. From each countable plate, the yeast colonies were inspected by naked eye and grouped according to their macromorphology (nine plates per cheese sample). To obtain an abundance of each species the morphotypes were enumerated and representative colonies from every countable plate were streaked to obtain a pure culture for further identification. The yeast isolates were preserved in 10% (v/v) glycerol at –80 °C.

Genomic DNA from pure cultures was isolated using a MasterPure Yeast Isolation kit (Epicentre, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. The ITS (ITS1 and ITS2) and 5.8S rRNA gene regions were amplified using ITS1 and ITS4 primers (White et al., 1990) as described previously (Cadež et al., 2002) and were digested with restriction enzymes HaeIII, CfoI and HinfI. Additionally, for separation between *D. hansenii* and *Candida zeylanoides*, restriction enzymes DdeI and MseI were used. The digests were separated on 2.5% agarose gels. The isolates sharing identical restriction patterns were grouped by computer using BioNumerics ver. 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

The final identification of the yeast species was determined by sequencing the D1/D2 domain of the large subunit rRNA gene or ITS using primer pairs NL1/NL4 and ITS1/NL4, respectively, (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands) as described by Cadež et al. (2003). Identified strains were deposited in the ZIM Collection of Industrial Microorganisms and their nucleotide sequences were deposited in the GenBank/EMBL/DBJ database.

2.4. Physiological and technological characterisation of the isolates

Gram-positive and catalase-negative isolates of LAB were characterised by physiological tests such as growth at 4.0 and 6.5% (w/w) NaCl in MRS and M17 broth, production of carbon dioxide from glucose by sub-culturing the isolates in Durham tubes with MRS broth, L-arginine and esculin hydrolysis, citrate utilisation, diacetyl production (only for LAB which coagulated casein), activity in milk and testing in litmus milk (Veljović et al., 2007).

Antimicrobial activity of LAB isolates was detected by an agar-well diffusion assay using *L. lactis* subsp. *cremoris* NS1, *Lb. plantarum* A112 and *L. lactis* subsp. *lactis* BGMN1-596 as indicator strains, as described previously (Lozo et al., 2004). Proteolytic activity of LAB isolates was determined by incubating washed cells of the bacteria with casein and by measuring protein degradation by SDS PAGE, according to Kojic et al. (1991). Lipolytic activity of yeasts was examined on Tributyrin agar

(Fluka) with an incubation period of seven days at 26 °C. Further, yeast isolates were tested for their ability to assimilate galactose, lactose, DL-lactate and citrate in concentrations of 50 mM and to ferment 2% (w/w) lactose and galactose at 2.5% of NaCl in liquid media with the addition of Yeast Nitrogen Base (Difco, BD, NY, USA), as described in Kurtzman et al. (2011). The tests were performed in triplicate.

2.5. Statistical analysis

Classical ecology indexes were used to obtain species richness (S), with the Shannon–Wiener index (H') indicating general biodiversity and Simpson's index (D) for evaluating dominance of the species in each cheese sample, as follows:

$$S = \sum^N; H' = -\sum^N p_i \log_2(p_i); D = 1 - \sum^N (p_i)^2$$

Where N is the number of species and p_i is the number of isolates belonging to one species in the sample. Clustering was carried out in Statistica 7.0 for Windows (StatSoft Inc. USA) and in BioNumerics 6.5 using the algorithm "Unweighted Pair-Group Average Linkage Analysis". Distances between the clusters were assessed using "Percent of disagreement".

3. Results

3.1. Enumeration, isolation and identification of lactic acid bacteria from cheese samples

Eighteen cheeses from specific localities in Serbia and Croatia were analysed. The viable counts of the main microbial groups present in the cheese samples are shown in Table 1. The total counts of LAB in the nine white pickled (BG) cheese samples, determined on MRS and M17 agar plates, varied in the range of 8.2 log CFU/g (BGG05) to 9.5 log CFU/g (BGAL3), while in the fresh soft (ZG) cheese samples the total LAB counts varied in the range of 3.3 log CFU/g (ZGPR3) to 10.5 log CFU/g (ZGBP5).

The preliminary identification of LAB isolates was based on catalase activity, Gram staining and cell morphology. The results showed that 717 isolates were Gram-positive and catalase-negative (390 colonies from BG cheeses and 327 colonies from ZG cheese samples) and they were further characterised by physiological tests. Finally, the rep-PCR, using (GTG)₅ fingerprinting, was performed and 88 LAB isolates with different fingerprinting profiles were selected for 16S rDNA sequencing (Fig. S1). The sequences of the strains were deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Database, European Nucleotide Archive (ENA ID: HE646352–HE646439, Fig. S1).

The predominant LAB species in BG cheeses (based on the physiological tests and (GTG)₅ fingerprint analysis of 390 LAB isolates) were *L. lactis* (34.10%), *Lb. plantarum* (16.92%), and *Ln. mesenteroides* (15.38%), while in ZG fresh soft cheeses the most dominant LAB species were *L. lactis* (26.30%), *E. faecalis* (17.74%), and *Ln. pseudomesenteroides* (16.82%). Interestingly, *Lb. plantarum* strains were the only lactobacilli species identified in ZG cheeses (ZGPR2, ZGPR3 and ZGZA7), as well as in BGVL1 and BGG011 cheeses. *Lb. plantarum* strains were also present in cheeses BGG05 and BGG07 together with *Lb. casei* and *Lb. rhamnosus*. Moreover, cheese BGG07 contained strains identified as *Lb. sucicola* and *Lb. helveticus*. Thirty-one out of 717 strains were identified either as *Strep. equinus* (isolated from cheeses BGAL1 and BGLE1) or *Strep. thermophilus* (from cheese ZGBP4). Enterococci species *E. faecalis*, *E. durans* and *E. faecium* encompassed 214 of 717 analysed strains (29.8%). It appeared that one out of 88 sequenced strains was identified as *Staph. warneri*, hence 87 LAB strains were further characterised. The *Ln. mesenteroides/pseudomesenteroides* group represented 146 of 717 strains (20.4%). In addition, 218 lactococci were found among the 717 isolates (30.4%), belonging to the species *L. lactis* (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) and one to *L. garviae*. Detailed frequency of occurrence of

Table 1
Mean counts* (log CFU/g) of lactic acid bacteria and yeasts in white-pickled^b and fresh soft^c cheeses from Western Balkan.

	BGG05	BGG07	BGG011	BGLE1	BGAL2	BGAL3	BGVL1	BGRL2	BGBU1	ZGPR1	ZGPR2	ZGPR3	ZGBP4	ZGBP5	ZGBP6	ZGZA7	ZGZA8	ZGZA9
Lab	8.2 ± 0.1	9.2 ± 0.22	9.0 ± 1.28	9.2 ± 0.03	9.5 ± 0.4	9.5 ± 0.06	8.6 ± 0.23	9.1 ± 0.09	9.4 ± 0.05	7.5 ± 0.07	9.0 ± 0.28	3.3 ± 0.02	8.8 ± 1.06	10.5 ± 0.06	8.9 ± 1.26	6.1 ± 0.05	6.7 ± 0.21	7.2 ± 0.03
Yeast	5.1 ± 0.12	7.2 ± 0.08	4.1 ± 0.27	8.5 ± 0.09	7.0 ± 0.13	8.1 ± 0.09	4.7 ± 0.22	5.4 ± 0.02	4.6 ± 0.3	–	4.4 ± 0.14	8.3 ± 0.04	–	–	–	7.7 ± 0.96	–	–

* Mean values of three replicates.

^b White-pickled cheeses designated by BG.

^c Fresh-soft cheeses designated by ZG.

LAB species, identified by 16S rDNA sequencing in combination with physiological tests and (GTG)₅ fingerprint analysis of the 717 LAB isolates, is presented in Fig. 1a.

3.2. The LAB diversity of the cheeses

The general index of LAB (H'_L) species diversity and the concentration of dominance (D) were calculated on the basis of the number of LAB species among 717 isolates, identified by 16S rDNA sequencing in combination with physiological tests and (GTG)₅ fingerprint analyses. The results suggest that seven out of 18 cheese samples contained three LAB genera, *Leuconostoc*, *Lactococcus* and *Enterococcus*, whereas lactobacilli were isolated from nine cheese samples. The highest

diversity of LAB species was found in the white pickled cheese BGG05 ($H'_L = 0.7$), where no fewer than six different LAB species were identified (*Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Ln. mesenteroides*, *E. durans*, *E. faecium*), and no dominance of any of species was scored ($D_L = 0.22$). *Leuconostocs* and lactococci were found in 15 out of the 18 cheeses and were most abundant in cheeses BGAL3 (30 out of 146 leuconostocs isolated from all cheese samples, 35.29% of the total number of isolates from the cheese) and BGAL2 (32 out of 218 lactococci isolated from all cheese samples, 69.57% of the total number of isolates from the cheese, $D = 0.53$), respectively (Fig. 1a). Enterococci were found in almost all cheeses except in ZGZA8. In general, ZGZA8 showed the lowest observed LAB species diversity ($H'_L = 0.22$). Only 15 colonies were obtained at all dilutions

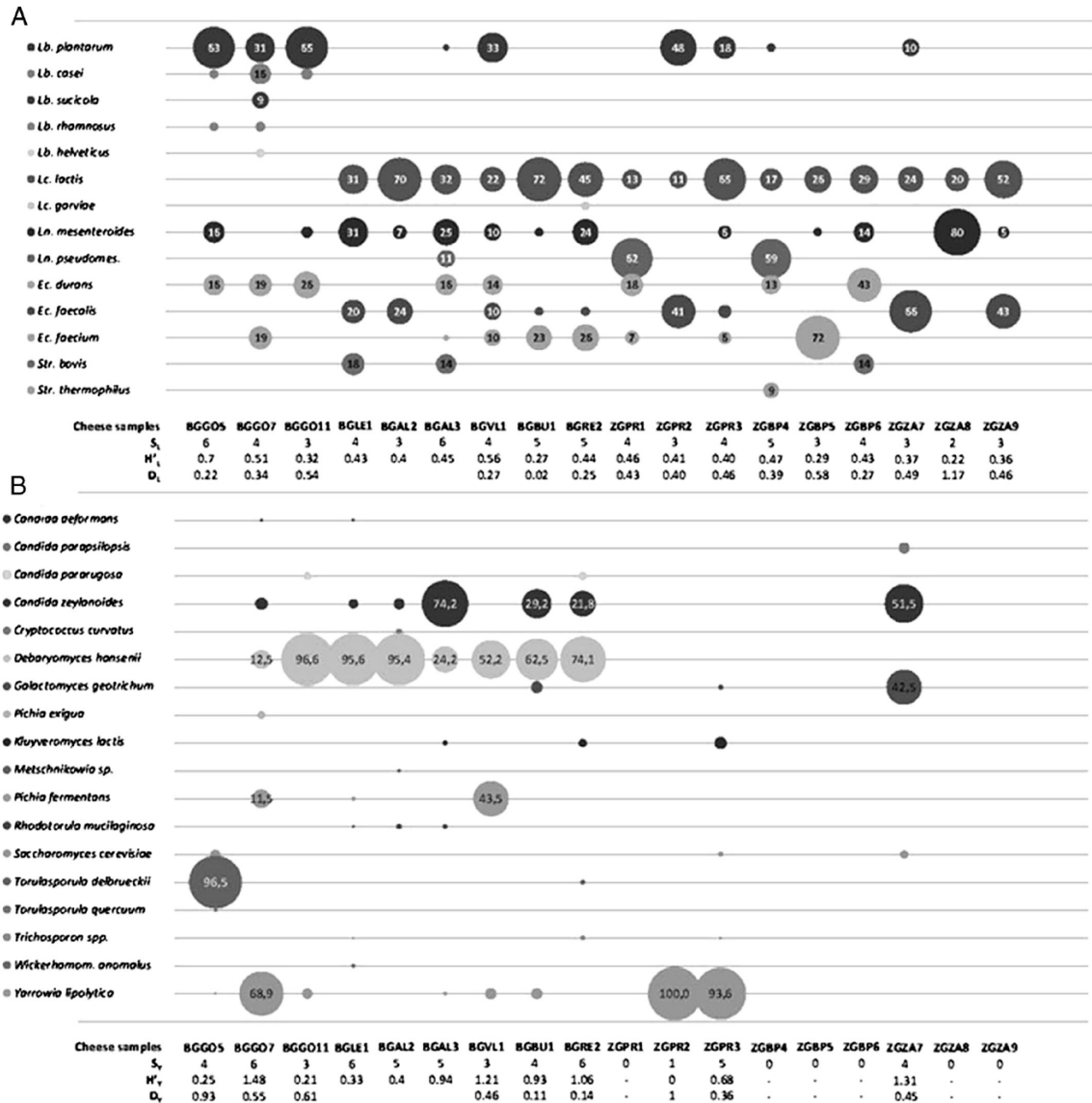


Fig. 1. Relative abundance (%) of lactic acid bacteria (A) and yeast (B) species in the cheese samples. The numbers of frequencies <5% are not indicated. Diversity indices of species richness (S), Shannon–Wiener index (H') indicating general biodiversity and Simpson's index (D) for evaluating dominance are presented for LAB (L) and yeasts (Y) for each cheese sample.

(14 out of 15 colonies were identified as LAB isolates – 12 leuconostocs, and 2 lactococci). The highest number of enterococci was identified in ZGBP5 (31 out of 214 enterococci isolated from all cheese samples, 72.10% of the total number of isolates from the cheese). Only 30 streptococci (4.18% of all isolates) were isolated from BGAL3 (12), BGLE1 (8), ZGBP4 (4) and ZGBP6 (6) cheeses (Fig. 1a).

3.3. Enumeration, isolation and identification of yeasts from cheese samples

As shown in Table 1, total yeast counts determined on YPD agar plates varied in the range of 3.1 log CFU/g (BGG011) to 7.5 log CFU/g (BGLE1). Yeasts were not present in six out of nine fresh soft cheeses from Croatia. Further, we enumerated yeast colony abundance on each countable plate and isolated 433 representative isolates from 12 cheese samples. They were further subjected to PCR-RFLP analysis of the ITS regions of the rRNA gene. Based on the restriction patterns generated by using three restriction enzymes, 433 isolates were grouped into 21 groups by using software (BioNumerics 6.6) and UPGMA cluster analysis (Fig. S2). Among these, 92 strains belonged to closely related species *D. hansenii* or *C. zeylanoides*, which were further separated by restriction enzymes DdeI and MseI (data not shown). Strains of *Y. lipolytica* and *Rhodotorula mucilaginosa* showed heterogeneous restriction profiles. The sizes of restriction patterns are presented in a supplementary table available online (Table S1). Altogether, sixty-eight strains isolated from different cheese samples were identified by sequencing of either the D1/D2 region of the LSU rRNA gene or by sequencing the ITS regions together with the D1/D2 region. The sequences of the strains were deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Archive (ENA ID: HE660050–HE660085, HE799657–HE799676, HF545658–HF545672). The species representatives were also characterised by traditional physiological tests (data not shown). Altogether, 20 yeast species were isolated, 17 of them from white pickled cheeses produced in Serbia (BG) and eight from fresh soft cheeses produced in Croatia (ZG).

In each cheese sample, three to seven yeast species were present, with the exception of a single species found in cheese ZGPR2. *Candida parapsilosis*, an opportunistic pathogen rarely found in cheese (Jacques and Casaregola, 2008), and *S. cerevisiae* were found only in the fresh soft cheese ZGZA7. Two *Trichosporon* species, *Tr. gracile* and *Tr. ovoides*, which are, respectively, usually associated with animals and humans (the causative agent of white piedra) (Sugita, 2011), were isolated from two white pickled cheese samples, BGLE1 and BGRE2, and one fresh soft cheese, ZGPR3. Further, the recently described species *T. quercuum*, found in the oral cavities of healthy Tibetans and in oak trees in China (Wang et al., 2009), was isolated from white pickled cheese BGG05. These species indicate that these artisanal cheeses are produced in poor hygienic conditions.

In just three out of the nine samples of fresh soft cheeses (ZG), seven different species of yeast were present. Among them, *Y. lipolytica* and *C. zeylanoides* predominated in two and one cheese samples, respectively.

3.4. The yeast diversity of the cheeses

To estimate the yeast species diversity, the general index of yeast species diversity (H'_y) and index for evaluating dominance (D) were calculated and are presented in Fig. 1b. The diversity of yeasts was the lowest ($H'_y = 0.25$) in cheese BGG05, as only four yeast species were isolated, and among them *T. delbrueckii* predominated (96.5%) (Fig. 1b). Interestingly, the highest yeast diversity ($H'_y = 1.48$) was found in a white pickled cheese from the same geographic location, preserved in brine for 60 days (BGG07), and among six yeast species *Y. lipolytica* predominated (68.6%).

Yeast species composition in fresh soft cheeses differed from white pickled cheeses, as in two out of three cheese samples *Y. lipolytica* predominated (ZGPR2 and ZGPR3) (Fig. 1b). In the third, fresh soft

cheese ZGZA7, *C. zeylanoides* and *Galactomyces geotrichum* represented a majority of yeasts (51.5% and 42.5%, respectively).

3.5. Technological characteristics of the isolates

The best activity in milk was mainly exhibited by lactococcal strains isolated from white-pickled BGBU1 and fresh soft ZGBP5 cheeses (53.5% and 44.2% strains of total number of isolates from the cheeses, respectively). They formed the curd during 4 to 6 h of incubation. Out of 87 LAB isolates the ability to degrade β casein was found in 23 lactococci, 13 lactobacilli, 19 enterococci and three leuconostocs strains (data not shown). A large number of lactococci and enterococci strains from BGBU1 (79%) and 58.7% of lactobacilli strains from ZGPR2 produced acetoin, while 76% of isolates (lactococci, enterococci and leuconostocs) from BGRE2 and ZGBP4 were able to utilize citrate. From ZGZA9 and ZGPR3 35% and 23.5% isolates, respectively, mainly enterococci were characterised as diacetyl producers. In addition, two lactococcal strains, one from BGAL1 and one from BGLE1, as well as five enterococci, four from BGG011 and one from ZGPR2 showed the aggregation phenotype, characterised by the clumping of the cells. Bacteriocin activity was determined in 11 lactococcal and five enterococcal strains.

Technological properties, such as extracellular lipolytic activity, assimilation or fermentation of lactose and galactose and assimilation of DL-lactate and citrate at 2.5% salt concentration, of 61 yeast strains were determined (Suppl. Table S2). The predominating species in fresh soft cheeses from Croatia, *Y. lipolytica* and *G. geotrichum*, were characterised by extracellular lipolytic activity. On the other hand, the predominating yeast in young white pickled cheeses from Serbia, *D. hansenii*, was characterised by the ability to assimilate major carbon sources found in cheese. Nevertheless, all yeast species could assimilate at least one carbon source, suggesting their active growth in the cheese environment.

4. Discussion

Strict EU food safety legislation has resulted in lower flexibility in food production and will eventually lead to the disappearance of a number of geographical and artisanal dairy products and their related indigenous microorganisms. The comprehensive evaluation of LAB and yeast diversity obtained in this study highlights the strong influence of unique production processes, such as the use of unpasteurised milk, the absence of starter culture, and the use of homemade rennet and brine, on the microbial ecology of the cheeses. Interestingly, the species composition of LAB and yeasts in the studied cheeses differed from similar styles of soft cheeses produced elsewhere, pointing to the importance of natural contamination by resident flora from specific geographical localities (Renyé et al., 2011; Lavoie et al., 2012; Laurencik et al., 2008; Martín-Platero et al., 2009). Moreover, the proportion between lactic acid cocci and rods differed in the analysed cheeses in correlation with the ripening time. The highest LAB species diversity was recorded in 10-day-old cheese BGG05 ($H'_L = 0.7$). Lactobacilli represent the dominant LAB in the 10-day-old white-pickled cheeses such as BGG05 and BGG011, 60-day-old BGG07 and 33-day-old BGVL1, while lactococci, leuconostocs and enterococci constitute the dominant bacterial population in the artisanal one-day-old fresh soft cheeses, which is in accordance with previously published results (Ayad, 2001; Jokovic et al., 2008). It seems that the higher degree of dominance of leuconostocs and enterococci (D approximately of 0.5) caused the lower diversity of LAB species found in fresh soft cheeses ZGBP5 and ZGZA9, as proposed previously by Cordero-Bueso et al. (2011). Regarding yeast species, the isolated yeast microbiota was diverse and region specific. In general, yeasts were present in all white pickled cheeses, but only in three out of nine fresh soft cheeses. The most widespread species occurring in white pickled cheeses from Serbia was *D. hansenii*, and in fresh soft cheeses from Croatia *Y. lipolytica* was most widespread. Interestingly, the results showed that the

opportunistic pathogen *C. parapsilosis*, isolated from ZGZA7 fresh soft cheese, as reported previously, assimilates galactose, lactate and citrate at 10% w/v NaCl, and had lipolytic activity, which means that it was metabolically active in the cheese (Suzzi et al., 2003; Alessandria et al., 2010; Delavenne et al., 2011). The diversity of yeast species in the studied cheese samples was generally higher than LAB species diversity (average $H'_{\gamma} = 0.8$), although a high dominance of *T. delbrueckii* (BGG05), *Y. lipolytica* (BGG07, ZGPR2) and *D. hansenii* (BGG011, BGLE1, BGAL2, BGAL3) was noticed.

Regarding the technological and functional potential of the LAB and yeasts isolates, the results obtained revealed that lactococci and lactobacilli, present in both types of cheeses, mostly contribute to the milk acidifying activity, while leuconostocs and enterococci produce typical flavour components such as acetaldehyde, acetoin and diacetyl and have beneficial effects in cheese making (Moreno et al., 2006). In general, the occurrence of yeasts in cheeses may contribute positively to flavour development during the stage of maturation or, on the other hand, may lead to product spoilage (Fleet, 1990; Corbo et al., 2001). The growth of yeasts contributes to the ripening process with two major functions: de-acidification and lipolytic and proteolytic activities (Bockelmann and Hoppe-Seyler, 2001; Beresford et al., 2001). In our study, extracellular lipase activity was exhibited by only a few strains, and of those only *Y. lipolytica* represented common cheese microbiota (Frolich-Wyder, 2003). Moreover, all yeast strains isolated during this study were adapted to grow in cheese, as they were capable of utilising at least one of the carbon sources present in cheese. The majority of the yeast isolates were able to assimilate lactate, suggesting that they represent a secondary microbiota in the white pickled and fresh soft artisanal cheeses. Recently, it has been shown that some yeast species frequently isolated from the cheese environment might contribute to the functional aspects of food, either by formation of biologically active peptides (Chaves-López et al., 2012) or with antioxidant and antigenotoxic activities (Trotta et al., 2012). However, additional studies would be required to confirm these functional properties of our isolates.

Concerning food safety, opportunistic bacteria (*Strep. equinus*, *L. garvieae*, *Staph. warneri*), enterobacteria (data not shown) and opportunistic yeasts (*C. parapsilosis* and *Trichosporon* sp.) were found in some samples (BGRE2, BGAL3, BGAL2, BGLE1, ZGPR3, ZGZA7 and ZGZA8), indicating poor sanitary conditions during production of the cheeses. Human pathogenic species such as *Listeria monocytogenes* were not found, while filamentous fungi were found in a small number of samples (results not shown).

Therefore, the results of this study indicate that the specific LAB and yeast microflora identified in the studied artisanal cheeses contribute to the quality and safety of the cheeses in terms of organoleptic characteristics, as well as in making the cheese environment less favourable for the development of undesirable, potentially harmful microorganisms. Moreover, many of the LAB and yeast strains isolated in this study belong to species with known probiotic representatives, indicating the possible health-promoting role of the artisanal products (Jankovic et al., 2010; Nikolic et al., 2012; Klingberg et al., 2005).

In conclusion, this study indicates that artisanal white pickled and fresh soft cheeses manufactured in Serbia and Croatia are a gold mine in terms of the diversity of LAB and yeasts strains, with considerable genetic, metabolic, and technological potential. The results obtained in this study could be interesting to dairy companies for the formulation of functional starter cultures in the production of innovative artisanal-like foods with a distinct geographical origin.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032>.

Acknowledgments

This work was funded by the SEE-ERA-NET Plus Project ERA-195/01 (PSALAB), the Ministry of Education and Science of the Republic of

Serbia, grant OI 173019, and Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia (Project 0581990 "Probiotics, prebiotics and functional starter cultures"). The authors thank Jure Zupan for his help with figure preparation. Petra Doušová is acknowledged for her technical assistance. We are grateful to Nathaniel Aaron Sprinkle, native English editor for the proofreading of the manuscript.

References

- Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Pattono, D., Dalmasso, A., Civera, T., Cocolin, L., 2010. Microbiota of the Planalto de Bologna: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 2211–2221.
- Ayad, E.H.E., 2001. Characterization of lactococci isolated from natural niches and their role in flavour formation of cheese. (PhD Thesis) Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259–274.
- Bockelmann, W., Hoppe-Seyler, T., 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* 11, 307–314.
- Cadez, N., Raspor, P., de Cock, A.W., Boeckhout, T., Smith, M.T., 2002. Molecular identification of and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Research* 1, 279–289.
- Cadez, N., Poot, G.A., Raspor, P., Smith, M.Th., 2003. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1671–1680.
- Chaves-López, C., Tofalo, R., Serio, A., Paparella, A., Sacchetti, G., Suzzi, G., 2012. Yeasts from Colombian Kumis as source of peptides with Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk. *International Journal of Food Microbiology* 159, 39–46.
- Chebeňová-Turcovská, V., Zeniřová, K., Kuchta, T., Pangallo, D., Brežňák, B., 2011. Culture-independent detection of microorganisms in traditional Slovakian bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150, 73–78.
- Corbo, M.R., Lanciotti, R., Albenzio, M., Sinigaglia, M., 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology* 69, 147–152.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., 2011. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 145, 132–139.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.-L., Barbier, G., Le Blay, G., 2011. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology* 151, 247–251.
- Ferreira, A.D., Viljoen, B.C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 86, 131–140.
- Fleet, G.H., 1990. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 199–211.
- Frolich-Wyder, M.T., 2003. Yeasts in dairy products. In: Boeckhout, T., Robert, V. (Eds.), *Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*. Behr's Verlag, Hamburg, pp. 209–237.
- Golić, N., Strahinic, I., Terzić-Vidojević, A., Begović, J., Nikolic, M., Tolinački, M., Topisirović, L., 2012. Molecular diversity among natural populations of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum/paraplantarum* strains isolated from autochthonous dairy products. *European Food Research and Technology* 234, 627–638.
- Jacques, N., Casaregola, S., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 126, 321–326.
- Jankovic, I., Sybesma, W., Phothirat, P., Ananta, E., Mercenier, A., 2010. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 175–181.
- Jokovic, N., Nikolic, M., Begovic, J., Jovic, B., Savic, D., Topisirovic, L., 2008. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *International Journal of Food Microbiology* 127, 305–311.
- Jovic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., Kojic, M., 2009. Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Archives of Biological Sciences* 61, 159–165.
- Kirin, S., 2006. Autochthonous "Bjelovar's dried cheese". *Mjekarstvo* 56, 343–356.
- Klingberg, T.D., Pedersen, M.H., Cencic, A., Budde, B.B., 2005. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7528–7530.
- Kojic, M., Fira, Dj., Banina, A., Topisirovic, L., 1991. Characterization of the cell-wall bound proteinases of *Lactobacillus casei* HN14. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1753–1757.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boeckhout, T., Robert, V., 2011. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts, 5th edn. In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boeckhout, T. (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, vol. 1. Elsevier, Amsterdam, pp. 87–110.
- Laurencik, M., Sulo, P., Sláviková, E., Piecková, E., Seman, M., Ebringer, L., 2008. The diversity of eukaryotic microbiota in the traditional Slovak sheep cheese—bryndza. *International Journal of Food Microbiology* 127, 176–179.
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology* 92, 455–468.
- Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Kos, B., Habjanič, K., Blažič, M., Šušković, J., 2012. Characterisation and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technology and Biotechnology* 50, 141–151.

- Lozo, J., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Topisirovic, L., 2004. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBK2–16. *Journal of Food Protection* 67, 2727–2734.
- Mannu, L., Riu, G., Comunian, R., Frozzi, M.C., Scintu, M.F., 2002. A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewes, milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal* 12, 17–26.
- Martín-Platero, A.M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J., Martínez-Bueno, M., 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology* 26, 294–304.
- Moreno, M.R.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, 1–24.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N., Topisirovic, L., 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 122, 162–170.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N., Ruas-Madiedo, P., 2012. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BCGG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 158, 155–162.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M., Vaughan, E.E., 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16s rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1882–1892.
- Renye, J.A. Jr, Somkuti, G.A., Van Hekken, D.L., Guerrero Prieto, V.M., 2011. Short communication: characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *Journal of Dairy Science* 94, 3311–3315.
- Sørensen, L.M., Gori, K., Petersen, M.A., Jespersen, L., Arneborg, N., 2011. Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *International Dairy Journal* 21, 970–978.
- Sugita, T., 2011. *Trichosporon* Behrend (1890). In: Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. (Eds.), *The Yeasts, A Taxonomic Study*, vol. 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 2015–2061.
- Suzzi, G., Schirone, M., Martuscelli, M., Gatti, M., Fornasari, M.E., Neviani, E., 2003. Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Research* 3, 159–166.
- Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Veljovic, K., Ostojic, M., Topisirovic, L., 2007. Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlatar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 114, 36–42.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., Lozo, J., 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 112, 230–235.
- Trotta, F., Caldini, G., Dominici, L., Federici, E., Tofalo, R., Schirone, M., Corsetti, A., Suzzi, G., Cenci, G., 2012. Food borne yeasts as DNA-bioprotective agents against model genotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 153, 275–280.
- Veljovic, K., Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Ostojic, M., Topisirovic, L., 2007. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2142–2152.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25–40.
- Wang, Q.-M., Xu, J., Wang, H., Li, J., Bai, F.-Y., 2009. *Torulasporea quercuum* sp. nov. and *Candida pseudohumilis* sp. nov., novel yeasts from human and forest habitats. *FEMS Yeast Research* 9, 1322–1326.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, N., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, pp. 315–322.

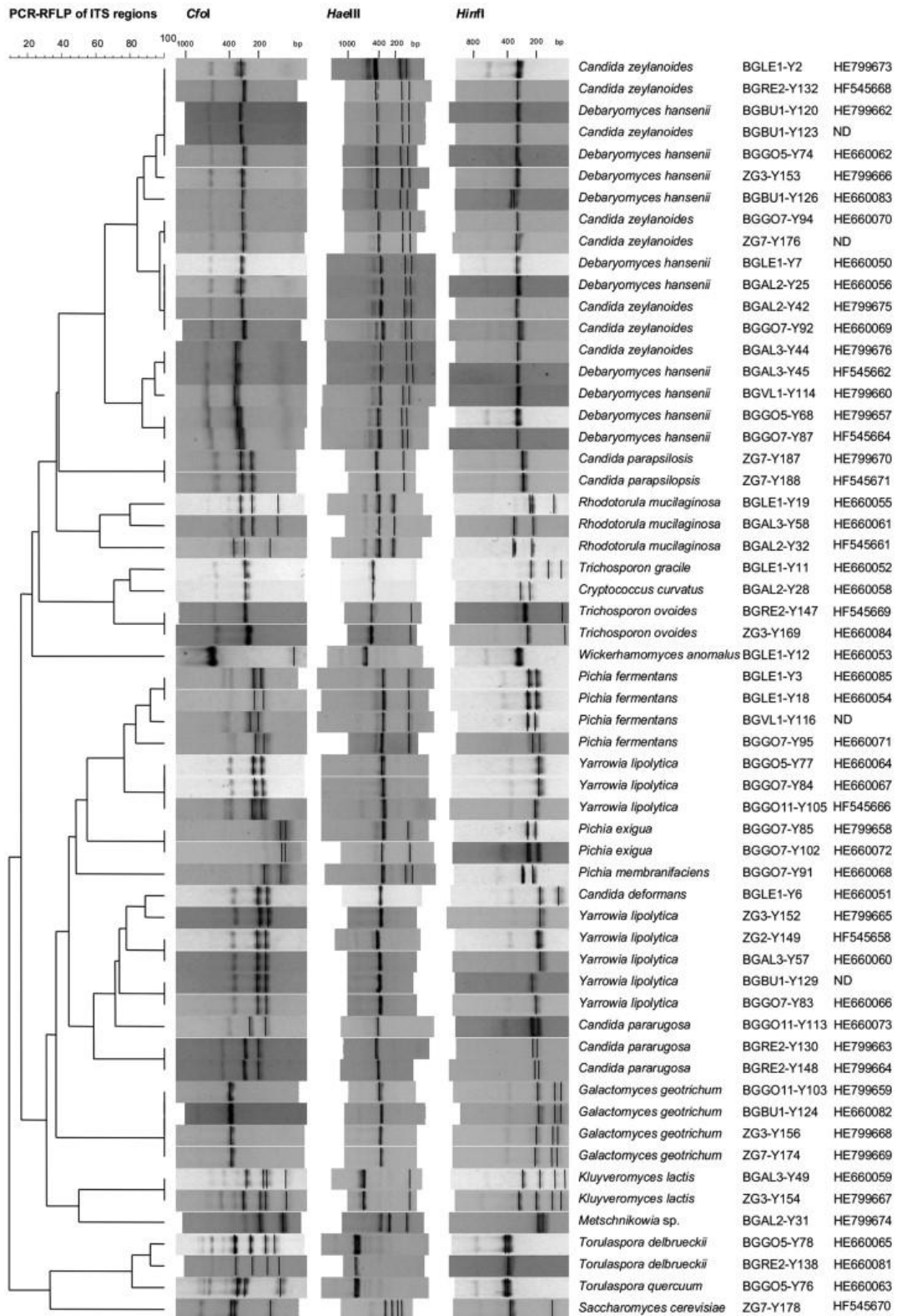
Doplňující informace k identifikaci kvasinek (dostupné pouze online):

Supplementary Table 1. Sizes (bp) of ITS-RFLP fragments of yeast species isolated from artisanal cheeses in Serbia and Croatia.

Species	AP ^a	Restriction fragments (bp)				
		<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>DdeI</i>	<i>MseI</i>
<i>Candida deformans</i>	380	200+150	380	180+100	^b	-
<i>Candida parapsilosis</i>	550	310+240	340+120	290+280	-	-
<i>Candida pararugosa</i>	420	250+160	420	230+190	-	-
<i>Candida zeylanoides</i>	650	300+60	430+140+90	325	300+200+120	410+120
<i>Cryptococcus curvatus</i>	500	280	470	300+240	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	650	300	430+140+90	325	420+200	320+140
<i>Galactomyces geotrichum</i>	400	400	400	195+115+100	-	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	750	270+170+155+80	675+90	280+180+110+80	-	-
<i>Metschnikowia</i> sp.	390	200+90	260+100	190+160	-	-
<i>Pichia exigua</i>	450	100+80	350+80	260+210	-	-
<i>Pichia fermentans</i>	450	225+170	345+90	250+200	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	500	160+100	360+100+40	280+220	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	650	315+240+105	405+220	235+220+115	-	-
	650	360+280+140	390+220	350+230	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	390+360+145	330+250+190+150	385+130	-	-
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	800	360+250+160+120	800	410+390	-	-
<i>Torulasporea quercuum</i>	800	340+285+100	800	410+390	-	-
<i>Trichosporon gracile</i>	550	280	480	230+140+90	-	-
<i>Trichosporon ovoides</i>	550	280	500+50	370+90	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	650	570+60	610	315	-	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	350	230+180	370	185	-	-
	380	200+160	360+70	220+180	-	-

^aAP = PCR amplification product (bp).

^b- Not determined.



Suppl. Fig.: UPGMA dendrogram of yeast species isolated from each cheese sample based on combined ITS restriction patterns generated with three restriction enzymes *CfoI*, *HaeIII* and *HinfI*. The list of yeast natural isolates identified by nucleotide sequencing is given together with the nucleotide sequence number (ENA ID).

PŘÍLOHA 5

**Culture-independent approach for semi-quantification and characterisation of yeast microbiota
in traditional Serbian cheeses**

Hana Šuranská, Peter Raspor, Ksenja Uroić, Nataša Golić, Blaženka Kos, Sanja Mihajlović, Jelena Beganović, Jagoda Šušković, Ljubiša Topisirović, Neža Čadež

V oponentním řízení v časopise *Food Microbiology*

Manuscript Number:

Title: Culture-independent approach for semi-quantification and characterisation of yeast microbiota in traditional Serbian cheeses

Article Type: Original Research Paper

Keywords: yeast, cheese, culture-independent method, ITS-clone library, DGGE

Highlights

- We used novel culture-independent approach to determine yeast abundance in cheese.
- We compare the new approach with culture-dependent and LSU-DGGE methods.
- The results highlight the discrepancies between methods used.
- ITS-clone library culture-independent method was the most sensitive method.
- Useful for analysing complex fungal communities of traditional cheeses.

Culture-independent approach for semi-quantification and characterisation of yeast microbiota in traditional Serbian cheeses

Hana Šuranská^{a,b}, Peter Raspor^a, Ksenja Uroič^c, Nataša Golič^d, Blaženka Kos^c, Sanja Mihajlović^d, Jelena Begović^d, Jagoda Šušković^c, Ljubiša Topisirović^d, Neža Čadež^{a*}

^aBiotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia

^bInstitute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

^cFaculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

^dInstitute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

***Corresponding author:** Neža Čadež, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenia, Tel: +386-1-3203757, Fax: +386-1-2574092, E-mail: neza.cadez@bf.uni-lj.si

Abstract

Here, we used a culture-independent, semi-quantitative technique based on construction of an internal transcribed spacer (ITS)–clone library from metagenomic DNA to investigate the complex of fungal communities associated with three traditional eastern Serbian cheeses and their by-products. This approach is based on direct total DNA extraction followed by amplification of fungal ITS regions, which were cloned into plasmids and restricted by endonucleases. This was compared with culture-dependent and culture-independent large subunit ribosomal RNA gene (LSU) denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) methods. Eight fungal species associated with cheese production were identified by the culture-dependent method, while 10 were identified by LSU-DGGE, and 17 by direct cloning (ITS–clone library). These results highlight the divergence of these methods. For instance, only the culture-independent methods detected the yeast and moulds *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata* and *Filobasidium globisporum*. The divergence among these methods was confirmed by correlation analysis, and by indices of general biodiversity and dominance of species. Moreover, the ITS–clone library approach combines the advantages of cultivation-based analysis and LSU-DGGE with semi-quantification of fungal species without the requirement for their cultivation. Finally, we emphasise the need to use both culture-dependent and culture-independent techniques for identification of such complex fungal communities.

Keywords: Yeast; identification; internal transcribed spacer–restriction fragment length polymorphism; denaturing gradient gel electrophoresis; internal transcribed spacer–clone library; cheese; culture-independent method.

1. Introduction

From the microbiological point of view, cheese is a complex and dynamic system that contains defined starter cultures and undefined variable natural microbiota, including bacteria, yeast and moulds (Irlinger and Mounier, 2009). Generally, the complexity and the various sensory properties of different cheeses depend on their microbial community. Yeast do not only result in cheese spoilage, as they also contribute to cheese ripening and maturation due to their lipolytic and proteolytic activities (Corsetti et al., 2001). Furthermore, yeast can support the function of starter cultures and other useful microorganisms, by assimilation of lactate and formation of alkaline metabolites. The formation of aroma compounds and the flavouring activity of yeast are indeed considered as the most important supporting functions for use of specific yeast in starter cultures for cheese production (Corsetti et al., 2001). This metabolism of lactate and the formation of alkaline metabolites such as ammonia from amino-acid deamination result in the deacidification of the cheese surface, which enables the growth of less acid-tolerant but more proteolytic and salt-tolerant microorganisms (Querol et al., 2006; Addis et al., 2001).

Generally, yeast communities can be identified by traditional and molecular approaches. Recent studies have demonstrated that the ecology of fermented foods cannot be effectively studied only by conventional culture-dependent methods, which require the isolation and cultivation of microorganisms prior to their identification by either physiological tests or molecular approaches (e.g., by internal transcribed spacer [ITS]–restriction fragment length polymorphism [RFLP] or by sequencing of ribosomal DNA regions). Indeed, when using culture-dependent methods, microorganism populations that are numerically fewer can often be out-competed on culture plates by numerically more abundant species (Jany and Barbier, 2008; Cocolin et al., 2013).

Culture-independent methods are thus commonly used to monitor community dynamics of fermented or spoiled foods, such as PCR denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and/or temporal temperature gradient gel electrophoresis. In these cases, microorganisms are detected not because they can grow on a specific medium, but because they have DNA that is the preferred

target for these approaches (Cocolin et al., 2013). These methods are based on direct DNA isolation and they can also provide a more reliable and complex image of the microbial ecology of cheeses (Bonetta et al., 2008; Quigley et al., 2011). Moreover, combination of both culture-dependent and culture-independent approaches can be used to describe the contributions of the individual microorganisms, with the identification of the members of a community, the determination of their abundance, and the analysis of the dynamics of the dominant microbial communities (Ndoye et al., 2011).

Furthermore, sequence-based studies of DNA obtained directly from environmental samples are revolutionising our view of microbial diversity. Techniques based on cloning of amplified target regions of DNA that can be extracted directly from environmental samples have become indispensable tools in bacterial ecology, although their use in studies of eukaryotic communities has been limited (O'Brien et al., 2005). Jany and Barbier (2008) reported that in terms of species richness, the microbial communities of cheese are much less complex than environmental samples, and hence they offer an ideal system to test the different identification methods.

Thus, the aim of this study was two-fold: (i) to use a semi-quantitative culture-independent approach based on the construction of an ITS-clone library from metagenomic DNA to evaluate the species richness, dynamics and abundance of yeast and moulds in various traditionally made cheeses and their by-products; and (ii) to compare this novel semi-quantitative method with culture-dependent identification of pure cultures and culture-independent LSU-DGGE, which is commonly used for profiling yeast communities (Prakitchaiwattana et al., 2004; Bonetta et al., 2008). As the Western Balkan Countries is a distinct geographical region in Europe where these Serbian white-pickled cheeses are made in households from non-pasteurised milk without using commercial starter cultures, high yeast diversity was expected.

2. Material and methods

2.1. Cheese samples

Three traditional, artisan-made, cheeses and their by-products (two samples of whey and brine) were collected from two locations in the eastern Serbia mountain region: Glavičak (location L1: 43°54'2" N, 21°44'23" E; altitude 866 m a.s.l.) and Bučina (location L2: 43°53'50" N, 21°44'50" E; altitude 930 m a.s.l.). The locality, type of cheese and milk, and other characteristics of these samples are described in Table 1. These traditional cheeses were produced in households from different kinds of raw milk, and without the use of any starter cultures.

The cheeses were made from fresh non-pasteurised milk by the addition of the rennet. The curd was rested for 10 min, and then mixed until the whey was clear and yellow-greenish (*ca.* 5 min). Afterwards, the curd was drained using pieces of cloth placed in the vats for the cheese draining, with pressure using weights of 2 kg per kg cheese mass, for about 2 h. To set the anaerobic conditions necessary for the ripening process, the pressed cheese curd was cut into small pieces, salted on the surface, and transferred into a vat containing brine. The cheese samples were kept in brine for 1, 3 or 10 days (Table 1, C1L1, C3L2, C10L1, respectively). Similarly, two whey and two brine samples were collected from these 1-day and 3-day cheese preparations (Table 1, WL1, WL2, BL1, BL2).

The samples were collected from the two households where they were made. All of the samples were placed into sterile plastic sealed containers that were transported to the laboratory immediately, under refrigeration. The microbiological analyses of the samples were performed within the following 48 h.

2.2. Yeast isolation by plating

For the isolation and enumeration of the yeast in the cheeses, 10 g of each cheese was added to 90 mL phosphate buffer and homogenised using a Stomacher blender for 60 s. For the whey and brine samples, 10 mL of each of these matrices was diluted in 90 mL phosphate buffer (PBS). These

sample suspensions were diluted in PBS and transferred onto YPD agar plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 2% agar) supplemented with 100 mg·mL⁻¹ ampicillin (Roche), as triplicate culture samples. The plates were incubated at 26 °C for 3 days to 5 days. The colonies were counted and grouped according to their morphology. Purified colonies were preserved in 10% (v/v) glycerol at -80 °C.

2.3. Isolate identification

The genomic DNA of the yeast was isolated using MasterPure™ Yeast Isolation kits (Epicentre, Madison, USA), according to the manufacturer instructions. The ITS (ITS1, ITS2) and 5.8S rDNA gene regions were amplified using the ITS1 and ITS4 primers (White et al., 1990), as described previously (Čadež et al., 2002), followed by digestion with the *HaeIII*, *HinfI* and *CfoI* restriction enzymes (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Two additional restriction enzymes, *DdeI* and *Tru9I* (Promega, Maddison, WI, USA), were used for the separation of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii*. The digests were separated in 2.5% agarose gel.

The representatives of the strains that had identical restriction patterns were characterised by physiological tests, as described by Kurtzman et al. (2011). The phenetic similarities of the yeast species were examined using the BioloMICS software (Robert and Szoke, 2006) from the Dutch Central Bureau for Fungal Cultures (CBS) database (<http://www.cbs.knaw.nl>).

The identities of the yeast species were confirmed using D1/D2 LSU rDNA sequencing provided by the commercial sequencing facility Macrogen (Amsterdam, The Netherlands). Sequence similarity searches were performed using the BLAST service of the National Center for Biotechnology Information database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The sequenced species were deposited in the Collection of Industrial Microorganisms (ZIM, Ljubljana, Slovenia) and their nucleotide sequences have been deposited in the databases of GenBank, European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and DNA Databank of Japan (DDBJ).

2.4. LSU rDNA-denaturing gradient gel electrophoresis

Total DNA was isolated from 0.5 g samples (see Table 1) by addition of 10 mL 2% (w/v) sodium citrate and 1 g glass beads (425-600 microns; Sigma) and vortexing for 3 min at room temperature. After incubation for 30 min at 45 °C, the glass beads were left to settle and the samples were decanted from the glass beads. The samples were then centrifuged (7,000× *g*, 10 min, 4 °C) and the fatty layer was removed (Jovčić et al., 2005). The DNA was then isolated using the MasterPure™ Isolation kits, according to the manufacturer instructions.

Nested PCR was used for amplification of a short region (250 bp) of the LSU rDNA, first using primers NL-1 and NL-4 (Kurtzman and Robnett, 1998), and second using NL-1 with a GC clamp and LS2 (Cocolin et al., 2000). DNA amplification was carried out in a final volume of 30 µL, which contained: 1× PCR reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 µM of each dNTP, 0.5 µM primers and 0.5 U *Taq* DNA polymerase (Promega). The PCR conditions were as follows: initial denaturation cycle at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of amplification, with denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 52 °C for 2 min, and extension at 72 °C for 2 min, with the final extension at 72 °C for 7 min.

The PCR products were separated in a sequence-specific manner using the DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in 6% to 8% polyacrylamide gradient gels (acrylamide/ bisacrylamide, 37.5:1) with the 30% to 60% denaturing gradient formed by 7 M urea (Sigma) and 40% formamide (Sigma), in a 1× Tris-acetate-EDTA (40 mM Tris, 20mM acetic acid and 1 mM EDTA, pH 8.0) running buffer. The electrophoresis was performed at a constant voltage of 170 V for 6.5 h at a constant temperature of 60 °C. The ethidium bromide stained DNA bands were visualised under UV light. Finally, the individual discrete bands were excised, extracted from the gel using QiaexII kits (Qiagen, The Netherlands), according to the manufacturer protocol, and sequenced as described above.

2.5. ITS–clone library restriction analysis

The ITS 5.8S rDNA gene region was amplified by PCR as described above. The PCR products were then purified using High Pure PCR Product Purification kits (Roche, Germany), following the manufacturer guidelines. Two microlitres of these purified PCR products were ligated into the pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, USA) according to the technical manual, and then transformed into CaCl₂-competent *Escherichia coli* DH5 α cells. The positive recombinants were screened on X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoly- β -D-dalactopyranoside)–isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside-ampicillin LB agar plates.

The cloned DNA fragments that were detected as positive colonies were directly amplified as colonies using the ITS1 and ITS4 primers with PCR as described above, with the pre-heating step at 98 °C for 5 min, and prior to the addition of the 0.5 U *Taq* DNA polymerase. The PCR products were digested using the three restriction endonucleases *Hae*III, *Tru*9I and *Dde*I, for 3 h at 37 °C, followed by electrophoresis in 2.5% (w/v) agarose gels. The recombinants with the same restriction pattern were grouped using the BioNumerics 6.5 software. Only the clones with unknown restriction patterns were sequenced by the MacroGen commercial sequencing facility. Their nucleotide sequences have been deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ databases.

2.6. Statistical analysis

The Shannon-Wiener index (H') and the Simpson's index (D) were used to estimate the general biodiversity and dominance, respectively, of the species in each sample, as follows:

$$H' = -\sum^N p_i \log_2(p_i);$$

$$D = 1 - \sum^N (p_i)^2$$

where N is the number of species, and p_i is the number of isolates belonging to one species in the sample.

3. Results

3.1. Cultivation-based method and microbial dynamics

The mean yeast counts (\pm standard deviation) from the three traditional, artisan-made, cheeses and their by-products that were collected from two distinct mountain farms located in eastern Serbia (locations L1 and L2; see section 2.1.) are listed in Table 2. The yeast density was highest in the 10-day-old cheeses ($6 \log_{10}$ colony-forming units [CFU] \cdot g⁻¹), which indicated their metabolic activity during the ripening process. The yeast counts for the 1-day-old and 3-day-old cheeses were comparable ($4 \log_{10}$ CFU \cdot g⁻¹), although these numbers differed significantly among the samples of whey ($2 \log_{10}$ and $5 \log_{10}$ CFU \cdot mL⁻¹) and brine ($5 \log_{10}$ and $6 \log_{10}$ CFU \cdot mL⁻¹), of both of the producers.

On the countable plates, the colonies were grouped and counted according to their macro-morphology. Eighty representative colonies were purified and later identified by cultivation-based ITS-RFLP and sequencing of the D1/D2 LSU rRNA gene. The nucleotide sequences of these strains have been deposited with the EMBL Nucleotide Sequence Archive (ENA ID: HE660050-HE660085). The counts of the individual yeast species are given in Table 2. In these cheeses, *D. hansenii* and *C. zeylanoides* were present in the highest numbers. On the other hand, *Kluyveromyces lactis* was present only in the cheese from location L1, while *Yarrowia lipolytica* and *Galactomyces geotrichum* were detected exclusively from location L2. Furthermore, moulds were not detected by the culture-dependent method.

3.2. Culture-independent LSU rDNA-denaturing gradient gel electrophoresis

The LSU-DGGE profiles obtained from these three traditional, artisan-made, cheeses and their by-products are shown in Figure 1, and the sequence comparisons of the excised bands from the gels are given in Table 3. *D. hansenii* and *Kl. lactis* were the main representatives in these DGGE profiles from the samples. Furthermore, *C. zeylanoides* was detected in the majority of samples, but the intensity of this band was not as high as for *Kl. lactis* and *D. hansenii*.

Apart from the yeast, DGGE bands corresponding to the filamentous fungus *Cladosporium* sp., *Cladosporium cladosporioides* and to plant DNA were also detected. Of interest, *Torulasporea delbrueckii* was not detected by DGGE in any of the samples, although its presence was confirmed by the cultivation-based and the cultivation-independent ITS–clone library RFLP methods. Nevertheless, most of the species identified by cultivation-dependant ITS-RFLP were also detected by LSU-DGGE (Table 4).

The detection limit of the yeast species identified by LSU-DGGE was 10^2 to 10^3 CFU·mL⁻¹ (g⁻¹). For the yeast concentration of 10^2 CFU·mL⁻¹, and its respective CFU·g⁻¹, the intensities of the bands on the DGGE gels were low. However, the detection limit of DGGE can be correlated with the presence of the predominating species. For example, in samples C1L1 and BL1 (i.e., a cheese sample and a brine sample, respectively, both from Glavičák; see Table 1 for sample coding) the concentrations of the yeast species differed by only 10-100-fold. In this case, all of the species detected by the culture-dependent method were confirmed also by DGGE. On the other hand, in the WL1 and C10L1 samples where the predominating species was present at 1000-fold higher concentrations than the minor species, these were not detected by DGGE. Moreover, the intensity of the DGGE fragments approximately corresponded to the yeast counts.

3.3. Culture-independent ITS–clone library restriction fragment length polymorphism

To estimate the yeast diversity in these three traditional, artisan-made, cheeses, a semi-quantitative culture-independent method was used that was based on the construction of the ITS–clone library from the metagenomic DNA of the cheese, whey and brine samples, followed by restriction analysis of the PCR-amplified ITS 5.8S rDNA. The results are given in Table 4 as the relative abundances of the particular species identified, either on the basis of the restriction fragment lengths or by sequencing.

For the yeast species detected by this approach, *D. hansenii* showed the highest numbers in all of the samples from location L1 (relative abundance, 44.3% to 94.5%), with the exception of the whey,

where *Kl. lactis* prevailed. *Kluyveromyces lactis* also predominated in the cheeses from location L2 (36.1%) but it was not detected by cultivation-based techniques. This indicates that these cheeses contained dead cells of *Kl. lactis*, especially as this was detected by DGGE as well.

Some of the species were detected in low frequencies. Moreover, some species were detected that were not isolated by the culture-dependent method, which have indeed rarely been associated with cheese-making environments. These included, for instance, *Cryptococcus albidus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Filobasidium globisporum* and the moulds of *Cladosporium* sp., *Alternaria alternata* and *Eurotium amstelodamii*. Furthermore, moulds were detected mainly in the by-products from location L2.

This ITS-clone library RFLP method revealed the highest indices of diversity in six out of seven samples, compared to the cultivation-dependant method and to DGGE (Table 4). Using this ITS-clone library method, *Candida pararugosa* was only not detected in cheese sample C10L1. Nevertheless, its frequency of occurrence on plates was only 0.2%. *Candida pararugosa* was also not detected by DGGE.

The detection limit of this ITS-clone library method was lower than of that of DGGE, as yeast at concentrations of 10^2 CFU·mL⁻¹ (g⁻¹) were detected. Unlike LSU-DGGE, using this ITS-clone library method, yeast species were also detected in samples in which their concentrations differed by more than 1000-fold.

The correlation between the culture-dependent method and the culture-independent ITS-clone library method is shown in Figure 2. The Pearson correlation factor of 0.55 indicates that these methods were only moderately in agreement. This disparity might be a consequence of either the detection of non-viable cells and/or DNA isolation and PCR amplification bias in the culture-independent method, or a selective-enrichment bias towards certain yeast species on the YPD medium (e.g., *Kl. lactis*).

4. Discussion

Cheese is a complex and dynamic ecosystem that has several selection pressures on the environmental microbiota, such as elevated salt concentration, low pH, and decreasing redox potential (Jany and Barbie, 2008; Beresford et al., 2001). Nowadays, culture-independent methods are widely used to study community dynamics of fermented foods (Cocolin et al., 2013). However, most of these methods lack information about the proportions of each species in the food and have relatively high detection limits (i.e., 10^3 CFU·ml⁻¹ [g⁻¹]; Cocolin et al., 2013) compared to culture-dependent methods. Thus, we used a culture-independent semi-quantitative method, the ITS–clone library method, to characterise the complex yeast and mould communities of traditional cheeses. This newly used method was evaluated compared to both standard cultivation-based methods and *LSU*-DGGE. This cultivation-based method is used as the golden standard for quantification and identification of viable yeast and moulds, the most important cheese-associated eukaryotic microorganisms.

Generally, the ITS–clone library method is based on a collection of ITS clones that are constructed *in vitro* by inserting PCR fragments of ITS regions into a cloning vector, followed by restriction analyses with three commonly used endonucleases (Esteve-Zarzoso et al., 1999). The restriction patterns were compared to our laboratory database of yeast, built into the BioNumerics programme. Only the clones of unknown restriction patterns were identified by sequencing. Using this approach, we circumvented the high costs of sequencing, which represents one of the main obstacles to the routine use of this method.

The species diversity of the secondary microbiota is important for the flavour and texture of traditional fermented food products, such as these traditional, artisan-made, white pickled cheeses from Serbia (Beresford et al., 2001; Golić et al., 2013). This direct ITS–clone library approach revealed greater species richness in these cheeses and their by-products (17 species in total) compared to the more commonly used techniques of the culture-dependent method (8 species) and *LSU*-DGGE (10 species). The culture-dependent method has several limitations, because this is heavily biased towards fast growing species, and many fungi have specialised growth requirements; thus, this

approach does not necessarily recover the whole ecosystem (O'Brien et al., 2005). Furthermore, populations that are numerically less important are not detected by the culture-dependent method, because these can be masked on the plates by the more abundant species (Jany and Barbier, 2008; Cocolin et al., 2013).

On the other hand, the more direct methods that depend on total DNA isolation can also have some limitations. These data can be skewed by the distribution of the PCR products, due to unequal amplification (PCR bias) or by the cloning efficiency. PCR bias is believed to be due to intrinsic differences in the amplification efficiencies of the templates, or to the inhibition of amplification by self-annealing of the most abundant templates during the late stages of amplification (Acinas et al., 2005). Moreover, fungal DNA extraction from the cheese matrix is a very difficult step, because the natural compounds, such as fats, proteins and salt, can inhibit the PCR. Moreover, cheese is overloaded with bacterial biomass, and so the total DNA might overburden the PCR reaction.

As well as the other advantages of culture-independent approaches, the ITS-clone library method also allowed the determination of the frequency of occurrence of each fungal species in these cheese environments. The ratio of the species is an important technological parameter that can enable the prediction of the flavour and quality of a cheese. Moreover, this information is relevant also for the construction of mixed starter cultures for the controlled production of traditional, region-specific cheeses. Nevertheless, there was only a moderate correlation ($r = 0.55$) between the frequency of species occurrence in these samples as determined by the ITS-clone library method and the culture-dependent method; this would suggest bias in the quantification by either one of these methods. The ITS-clone library method is biased due to the DNA isolation, the PCR and/or the cloning efficiency, and the culture-dependent method loses its accuracy either by dilution or by competition for space and nutrients on the culture dishes.

Our data demonstrate that the minor species are not all detected by plating. For instance, in the case of whey sample WL1, approximately two-fold more yeast species were identified by the ITS-clone library method than by the cultivation-based and *LSU*-DGGE methods. This confirms the higher

detection limit of the ITS–clone library method. Moreover, the significantly higher Shannon-Wiener diversity index (H') of the majority of the samples (6 out of 7) confirms the higher sensitivity of the ITS–clone library method.

The discrepancies between these methods might also be a consequence of the detection of dead cells, as was the case for *Kl. Lactis*, where only the ITS–clone library method detected this in the cheese (36.1%) and brine (5%) from location L2. *Kluyveromyces lactis* is commonly found in all types of milk (Delavenne et al., 2011). However, it has not been found as a predominant species in any of the traditional white-pickled cheeses of Serbia analysed by the culture-dependent method (Golić et al., 2013). Furthermore, additional species were detected only by direct cloning; i.e., *Saccharomyces cerevisiae* (C1L1; 1.1%), *Cr. albidus* (C3L2; 6.9%) and *H. uvarum* (BL1; 54.2%).

The discrepancies among these direct and indirect methods might also be a consequence of the media compositions, as some species have specific growth requirements and can be overgrown by the better-adapted species. This was the case for species of moulds of *F. globisporum*, *Cladosporium* spp., *E. amstelodami* and *A. alternata*, which can be detected in raw cow milk (Lavoie et al., 2012), and *Cl. Cladosporioides*, which is considered to be a very common, cosmopolitan saprobic species (Bensch et al., 2010).

For the *LSU*-DGGE analysis, it is generally accepted that the detection limit is *ca.* 10^3 CFU·mL⁻¹ or g⁻¹ (Cocolin et al., 2013). However, we detected fungal species in samples containing fungal counts below 10^3 CFU·mL⁻¹ or g⁻¹ by both of the culture-independent methods used here. At the same time, there was a discrepancy between these two culture-independent methods regarding the detection limit of the minor species in the samples; e.g. the moulds. These were detected by *LSU*-DGGE when they were present at 100-fold lower counts than the predominant species. On the other hand, using the ITS–clone library method, we detected species where the counts differed by 1000-fold.

Complete fungal characterisation in such analyses of traditional cheeses and their by-products allows the identification of these more complex communities that include yeast and moulds. The yeast population was more diverse for the Glavičak (location L1) cheeses and their by-products than

for the cheese matrices from the Bučina region (location L2). Furthermore, some of the species, such as *Kl. lactis*, *C. pararugosa*, *T. delbrueckii* and *Tr. ovoides*, were only isolated from the Glavičak cheeses. On the other hand, *G. geotrichum* and *Y. lipolytica* were only detected in the Bučina cheeses. *D. hansenii* and *C. zeylanoides* were present in all of the cheese samples. Indeed, these species are also predominant in other types of cheeses coming from Serbia (Golić et al., 2013). As *D. hansenii* produces antibacterial metabolites, its predominance in some cheeses might also reduce the risk of cheese spoilage by clostridial species (Prillinger et al., 1999). On the other hand, viable cells of *Kl. lactis* were isolated only from the cheeses from Glavičak.

5. Conclusions

In conclusion, we applied different culture-dependent and culture-independent molecular approaches to determine the ecology of the complex of yeast and moulds of cheeses and related matrices. The ITS-clone library culture-independent method was a more sensitive method than the *LSU*-DGGE culture-independent method and the culture-dependent method. Indeed, this approach appears to be relatively rapid and to offer the prospect of detecting a greater diversity of species than the application of methods using the classical culture media. Thus, although the standard cultivation techniques that are used for quantification and characterisation of yeast in food products are still considered to be the golden standard, our data here demonstrate that direct cloning can be used as an alternative. Direct cloning provides the opportunity to analyse complex communities in food products. Interestingly, new-generation DNA sequencing will add a molecular dimension to the understanding of flavour, taste and texture of cheeses during ripening (Ndoye et al., 2011). Finally, we might expect similar results using next-generation sequencing.

References

- Acinas, G. S., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., & Polz, F. M. (2005). PCR-induced sequence artifacts and bias: insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 8966–8969.
- Addis, E., Fleet, G. H., Cox, J. M., Kolak, D., & Leung, T. (2001). The growth, properties and interactions with the maturation of camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, *69*, 25–36.
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemse, M., Andersen, B., Summerell, B. A., Shin, H. -D., Dugan, F. M., Schroers, H. -J., Braun, U., & Crous, P. W. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*). *Studies in Mycology*, *67*, 1–94.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, *11*, 259–274.
- Bonetta, S., Bonetta, S., Carraro, E., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2008). Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology*, *25*, 786–792.
- Čadež, N., Raspor, P., de Cock, A. W., Boeckhout, T., & Smith, M. T. (2002). Molecular identification of and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Research*, *1*, 279–289.
- Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, *189*, 81–87.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., & Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *162*, 8-12.
- Corsetti, A., Rossi, J., & Gobbetti, M. (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, *69*, 1–10.

- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J. -L., Barbier, G., & Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology*, *151*, 247–251.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, *49*, 329–337.
- Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Šušković, J., Raspor, P., & Topisirović, L. (2013). Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*, *166*, 294–300.
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*, 142–148.
- Jany, J. -L., & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, *25*, 839–848.
- Jovčić, B., Golić, N., Kojić, M., & Topisirović, L. (2005). Molecular characterization of semi-hard homemade cheese microflora. *Acta Veterinaria (Beograd)*, *55*, 511–519.
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *73*, 331–371.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5thedn., vol. 1 (Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., eds.), pp. 87–110. Elsevier, Amsterdam.
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of province of Quebec. *Dairy Science and Technology*, *92*, 455–468.

- Ndoye, B., Andriamahery Rasolofo, E., LaPointe, G., & Roy, D. (2011). A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science and Technology*, *91*, 495–524.
- O'Brien, E. H., Parrent, L. J., Jackson, A. J., Moncalvo, J. M., & Vilgalys, R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 5544–5550.
- Prakitchaiwattana, Ch. J., Fleet, G. H., & Heard, G. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, *4*, 865–877.
- Prillinger, H., Molnár, O., Eliskases-Lechner, F., & Lopandic, K. (1999). Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek*, *75*, 267–283.
- Querol, A. (2006). Cheese. In: *Yeasts in food and beverages*. Fleet, G. H. (ed). Springer, Germany. 218–229.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, P. T., Ross, R. P., Fitzgerald, F. G., & Cotter, D. P. (2011). Molecular approaches to analysis the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *150*, 81–94.
- Robert, V., & Szoke, S. (2006). BioloMICS Software. BioAware. <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICS.aspx>.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Innis N., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T., eds.), pp. 315–322. London: Academic Press.

Table 1. Origin of the three traditional, artisan-made, Serbian white pickled cheeses and their by-products analysed in this study.

Cheese sample	Locality	Altitude (MSL)	Type of Cheese	Milk
Cheese (C1L1) Whey (WL1) Brine (BL1)	L1 Glavičak, Mountain Beljanica The closest city Despotovac Eastern Serbia region	1005	White-pickled 1 day old	Ewes´ Uncooked Non-pasteurised
Cheese (C10L1)	L1 Glavičak, Mountain Beljanica The closest city Despotovac Eastern Serbia region	1005	White soft 10 days old	Ewes´ Uncooked Non-pasteurised
Cheese (C3L2) Whey (WL2) Brine (BL2)	L2 Bučina, Mountain Beljanica The closest city Despotovac Eastern Serbia region	800	White semi hard 3 days old	Cows´ (20 %) Ewes´ (80 %) Uncooked Non-pasteurised

Table 2. Yeast species distributions identified by the cultivation-based method for the three traditional, artisan-made, Serbian white pickled cheeses and their by-products analysed in this study.

Species	Location L1 (Glavičak)				Location L2 (Bučina)		
	C1L1	C10L1	WL1	BL1	C3L2	WL2	BL2
	(CFU·g ⁻¹)	(CFU·g ⁻¹)	(CFU·mL ⁻¹)	(CFU·mL ⁻¹)	(CFU·g ⁻¹)	(CFU·mL ⁻¹)	(CFU·mL ⁻¹)
	(×10 ³)	(×10 ³)	(×10 ³)	(×10 ³)	(×10 ³)	(×10 ³)	(×10 ³)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	10 ±0.26	1900±130	33±0.47	10±0.082	2.0±0.21		1700±120
<i>Kluyveromyces lactis</i>	3.7±0.25	10±1.4	360±12	120±2.8			
<i>Candida zeylanoides</i>	4.7±0.59	130±3.9		2.0±0.14	4.6±0.12	0.333±0.047	
<i>Trichosporon ovoides</i>	1.7 ±0.12	3.3±0.47		1.7±0.12			
<i>Candida pararugosa</i>	0.33· ±0.047	3.3±0.47	33±4.7				
<i>Torulaspota delbrueckii</i>		6.7 ±0.94		1.0±0.047			
<i>Galactomyces geotrichum</i>					0.33±0.047		
<i>Yarrowia lipolytica</i>					0.33±0.047		
Total	21	2100	400	130	7.3	0.333	1700

Table 3. Identities of the bands obtained from the yeast community of the three traditional, artisan-made, Serbian white pickled cheeses analysed in this study.

Marked zone	Closest relative (identified species)	% Identity ¹	Source sample ²
1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	100	WL1; BL1; C1L1; C10L1; C3L2
2	<i>Candida zeylanoides</i>	99	WL1; BL1; WL2; C10L1; C3L2
3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100	WL1; BL1; BL1; C1L1; C10L1
4	<i>Trichosporon ovoides</i>	99	BL1; C1L1; C10L1
5	<i>Candida pararugosa</i>	100	WL1; C1L1
6	<i>Galactomyces geotrichum</i>	100	C3L2
7	<i>Yarrowia lipolytica</i>	100	C3L2
8	<i>Saturnispora</i> sp.	100	C3L2
9	<i>Geotrichum</i> sp.	100	BL2; WL2
10	<i>Debaryomyces</i> sp.	99	WL2
11	<i>Cladosporium</i> sp.	99	WL2
12, 13, 14	Plant DNA	100	BL1; C1L1

¹ % of identical nucleotides in the sequence obtained from DGGE zones and the sequence of the closest relative found in the GenBank database.

² the presence of yeast species in analyzed samples.

Table 4: Frequency (%) of yeast species in samples represented as a heat map. Species identified by culture-dependent ITS-PCR-RFLP (CD); culture-independent ITS-clone library restriction analysis (CI) and by LSU-DGGE (CID). + designate the presence of species.

Species	Location 1												Location 2											
	Whey 1 (WL1)			Brine 1 (BL1)			Cheese (1d) 1			Cheese (10d)			Cheese (3d) 2			Whey 2 (WL2)			Brine 2 (BL2)					
	CD	CI	CID	CD	CI	CID	CD	CI	CID	CD	CI	CID	CD	CI	CID	CD	CI	CID	CD	CI	CID			
<i>Debaryomyces hansenii</i>	7.7	24.7	+	7.5	44.3	+	50	94.5	+	92.8	83.3	+	27.3	4.2					100	7.5	+			
<i>Candida zeylanoides</i>		11.8	+	1.5	13.3	+	22.6	1.1		6.0	7.3	+	63.7	27.8	+	100		+						
<i>Trichosporon ovoides</i>		2.2		1.3	17.0	+	8.1	1.1	+	0.2	6.2						8.3							
<i>Torulasporea delbrueckii</i>		3.2		0.3	1.0			1.1		0.3	2.1													
<i>Kluyveromyces lactis</i>	84.6	52.7	+	89.4	24.4	+	17.7		+	0.5	1.1	+		36.1	+							5.0		
<i>Candida pararugosa</i>	7.7	4.3	+				1.6	1.1	+	0.2														
<i>Galactomyces geotrichum</i>													4.5	15.3	+									
<i>Yarrowia lipolytica</i>													4.5	9.7	+									
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								1.1																
<i>Filobasidium globisporum</i>		1.1																						
<i>Cryptococcus albidus</i>														6.9										
<i>Hanseniaspora uvarum</i>																	54.2							
<i>Cladosporium cladosporioides</i>																						55.0	+	
<i>Cladosporium sp.</i>																	12.5	+						
<i>Eurotium amstelodami</i>																							2.5	
<i>Alternaria alternata</i>																							2.5	
Uncultured fungus																	25.0						27.5	
No. of colonies/clones	801	93	–	397	45	–	64	91	–	917	95	–	22	75	–	1	24	–	5	40	–			
No. of species	3	7	4	5	5	4	5	6	5	6	5	4	4	6	4	1	4	2	1	6	1			
H^a	0.57	1.41	–	0.62	1.91	–	1.37	0.43	–	0.45	0.93	–	1.33	2.24	–	0	1.65	–	0	1.75	–			
D^b	0.99	0.92	–	0.19	0.70	–	0.69	0.11	–	0.14	0.3	–	0.52	0.75	–	0	0.62	–	0	0.61	–			

^a Shannon-Wiener index; ^b Simpson's index

Figure legends

Figure 1. LSU-DGGE profiles of DNA from yeast, as isolated directly from the cheeses and their by-products. The bands indicated by numbers were excised and subjected to sequencing. The identities of the bands are reported in Table 3. NC, negative control; M, DGGE markers for sequenced yeast: CP, *Candida pararugosa*; CZ, *Candida zeylanoides*; YP, *Yarrowia lipolytica*; GG, *Galactomyces geotrichum*; DH, *Debaryomyces hansenii*; KL, *Kluyveromyces lactis*; TO, *Trichosporon ovoides*.

Figure 2. Correlation between the relative abundances determined by the culture-dependent and the culture-independent ITS-clone library methods. R^2 , regression. Pearson coefficient, $r = 0.55$, $p = 0.008$.

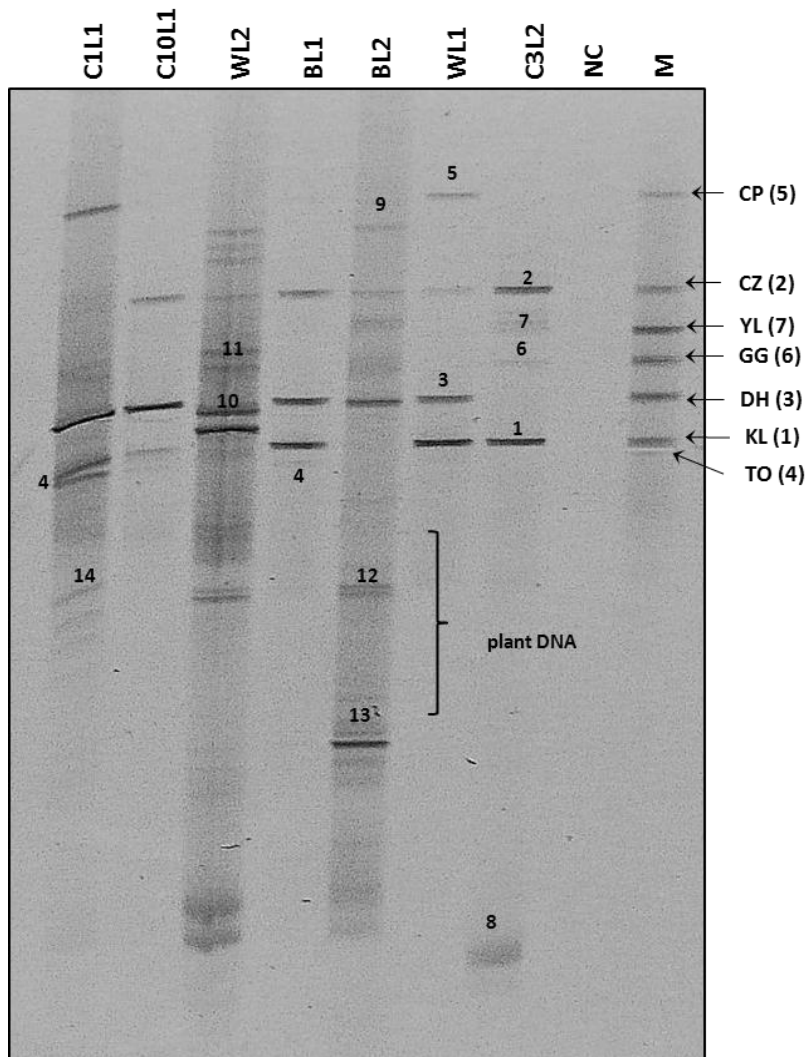


Figure 1

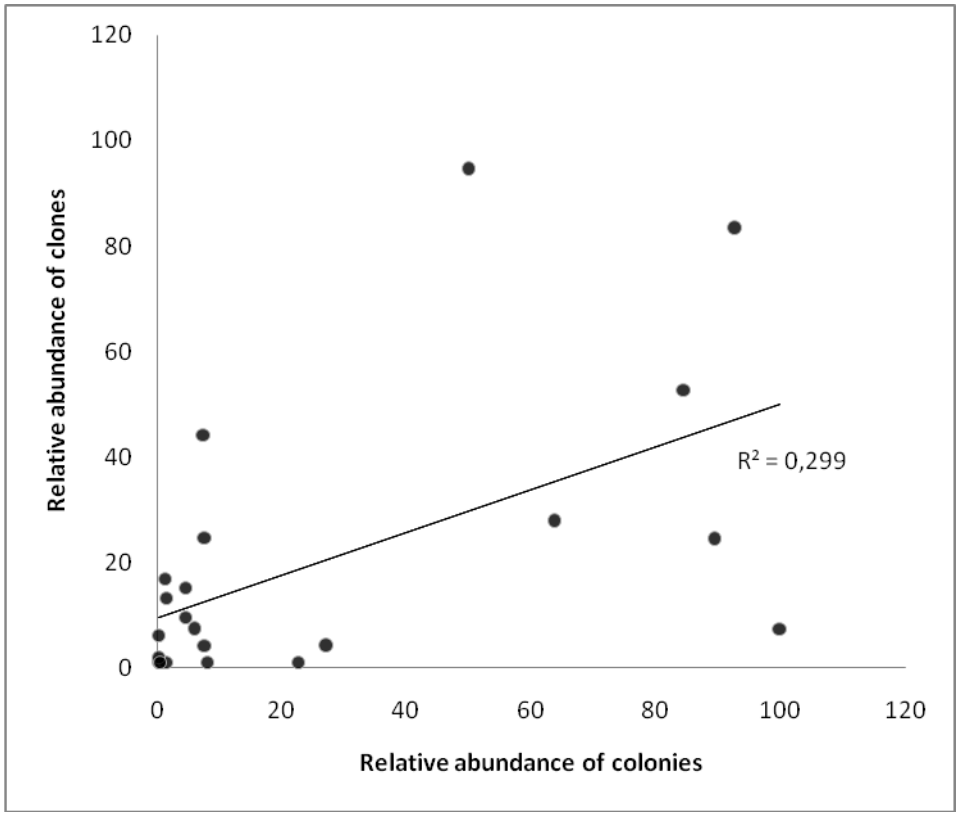


Figure 2

PŘÍLOHA 6

Doplňující informace

Seznam použitých sbírkových kmenů rodu *Saccharomyces* (z CCY Bratislava)

Seznam sekvenovaných izolátů

Tab 1: Seznam použitých sbírkových kmenů rodu *Saccharomyces*, jejich sbírkové číslo, pracovní označení, zdroj izolace a taxonomické zařazení fyziologickými testy.

No	CCY	Druh	Zdroj izolace
s10	21-4-77	<i>S. cerevisiae</i>	patentový kmen
s11	21-4-81	<i>S. cerevisiae</i>	víno
s12	21-4-111	<i>S. cerevisiae</i>	švestkový list
s13	21-4-113	<i>S. cerevisiae</i>	meruňkový list
s71	21-31-10	<i>S. bayanus</i>	houby, Záhoří
s80	T	<i>S. bayanus</i>	Typový
s82	48-82	<i>S. bayanus/S. pastorianus</i>	dělení podle CBS – Holandská sbírka
s86	21-31-5	<i>S. bayanus</i>	jablečný džus (CBS 425)
s87	21-6-3	<i>S. pastorianus</i>	bez zdroje
s88	21-11-3	<i>S. bayanus</i>	bez zdroje
s89	21-21-43	<i>S. cerevisiae</i>	víno
s90	21-11-1	<i>S. cerevisiae</i>	není zdroj
s91	21-48-1	<i>S. cerevisiae</i>	bílé víno, Španělsko
s92	21-12-3	<i>S. cerevisiae</i>	víno růžové, Portugalsko
s93	21-46-1	<i>S. cerevisiae</i>	červené víno, Španělsko
s102	21-6-7	<i>S. pastorianus T</i>	neotyp, bez zdroje
s104	48-80	<i>S. bayanus var. uvarum</i>	džus černý rybíz, typový, CBS 395
s105	48-79	<i>S. bayanus var. uvarum</i>	džus černý rybíz, typový, CBS 395
s106	21-53-2	<i>S. paradoxus</i>	půda
s114	21-4-26	<i>S. cerevisiae</i>	bez zdroje
s115	21-15-2	<i>S. cerevisiae (S. willianus)</i>	bez zdroje
s117	21-21-2	<i>S. cerevisiae (S. oviformis)</i>	víno Rača
s118	21-21-16	<i>S. cerevisiae (S. oviformis)</i>	víno Rača
s119	21-5-1	<i>S. kluyveri (L. kluyveri)</i>	vinné mušky
s120	21-6-1	<i>S. pastorianus</i>	bez zdroje
s121	21-6-4	<i>S. pastorianus</i>	bez zdroje
s122	21-9-1	<i>S. exiguus (Kaz. exigua)</i>	neotyp, bez zdroje
s123	21-47-1	<i>S. cerevisiae</i>	z Alpecina, olivové pokrutiny
s125	21-4-55	<i>S. cerevisiae</i>	houby, Kuřim
s127	21-57-1	<i>S. kudriavzevii</i>	rozkládající se list
s132	21-58-1	<i>S. mikatae</i>	půda
s133	21-4-93	<i>S. cerevisiae</i>	sekvojový list
s73/s77	21-13-1	<i>S. bayanus</i>	bez zdroje
s75/s83	21-4-96	<i>S. cerevisiae T</i>	bez zdroje
s78/s84	21-31-6	<i>S. bayanus</i>	bez zdroje
s79/s116	21-15-5	<i>S. cerevisiae (S. willianus T)</i>	zkažené pivo, CBS 381
s81/s85	21-31-13	<i>S. cerevisiae</i>	bez zdroje
s94/s103	21-6-6	<i>S. pastorianus</i>	bez zdroje
s95/s74	21-42-1	<i>S. cerevisiae</i>	hroznový mošt
s129	21-41-1	<i>S. wickerhamii T (Kl. wickerhamii)</i>	vinná muška
s86/s134	21-31-5	<i>S. bayanus</i>	jablečný džus (CBS 425)
s135	26-16-1	<i>S. exiguus (C. holmii)</i>	CBS (z roku 1947)
s136	21-57-2	<i>S. kudriavzevii</i>	homotalická monosporická kultura IFO 1803*
s138	21-53-1	<i>S. paradoxus</i>	<i>Drosophila</i> sp., USA

* připraveno Naumovem

Tab. 2, 3: Souhrn teplotních a časových profilů aplikovaných PCR reakcí.

	RAPD (M13)			Interdelta-PCR			ITS-PCR			rep-PCR			rep-PCR (M13)		
	<i>T</i> (°C)	<i>T</i> (min)		<i>T</i> (°C)	<i>T</i> (min)		<i>T</i> (°C)	<i>T</i> (min)		<i>T</i> (°C)	<i>T</i> (min)		<i>T</i> (°C)	<i>T</i> (min)	
Denaturace	94	4		95	4		94	4		94	2		95	5	
Hybridizace	94	0,5	35×	94	0,5	30×	94	1	25×	94	2	35×	93	0,75	40×
	36	0,5		49	1		48	0,5		55	1		50	1	
	72	0,75		72	2		72	1		72	3		72	1	
Extenze	72	7		72	10		72	10		72	5		72	6	

Touchdown PCR			
	<i>T</i> (°C)	<i>T</i> (min)	
Denaturace	94	2	
Hybridizace	94	0,5	3×
	68	0,5	
	72	0,5	
	94	0,5	3×
	65	0,5	
	72	0,5	
	94	0,5	3×
	62	0,5	
	72	0,5	
	94	0,5	25×
	60	0,5	
	72	0,5	
Extenze	72	2	

Tab. 4: Velikosti ITS-PCR-RFLP fragmentů a PCR amplikonů izolovaných druhů, které byly podrobeny parciální ITS sekvenaci.

Vzorek	ITS-PCR (bp)	ITS-RFLP (bp)						Druh
		<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>TaqI</i>	<i>HhaI (CfoI)</i>	<i>AclI</i>	<i>MseI</i>	
36-11R	450	380+50	250+200	150+110+80	170+100+90+70	400+60	280+110+70+50	<i>P. fermentans</i>
57-11R	450	380+80	250+200	170+120+60	170+100+60+50	390	280+120+50	
55-11S	450	380+70	250+200	150+110+70+60	165+100+70+50	400	280+110+70+50	
125-09	520	340+90+40	290+200	220+160+60	250+100+70+70	320+90	440	<i>P. membranifaciens</i>
117-11R	450	310+80+40	200+160+100	220+100+60	230+100+60+60	290+120	200+150	
114-10	480	320+90+50	260+210	200+100+60	235+105+60+60	320+100+80	300+150	
121-10	450	300+80+50	250+200	200+160+60	220+100+70+60	300+100	170+110+110	
77-10	480	340+90+50	280+200	220+160+60+70	170+100+90+70	320+100	480	
121-11R	480	340+90+50	280+200	220+150+60	170+100+90+70	320+100	480	
129-10	520	390+90+40	230+150+140	250+110+80	210+180+70+60	350+120	520	<i>P. kudriavzevii</i>
128-10	500	400+100	210+150+140	220+120+60	220+180+70+50	350+80	500	
90-11R	500	400+80	210+150+140	220+100+60	210+180+60	370	510	<i>I. orientalis</i>
150-09	500	320+80+60	250+110+100	220+180+80	230+100+60+60	420+70	370+50	<i>I. occidentalis</i>
30-11R	450	300+80+50	240+110+100	200+160+60	220+100+70+60	400	410	
102-10	450	300+80+50	240+110+100	180+160+60+50	235+110+90	400	410	
60-09	470	300+80+50	250+110+100	200+160+60	220+100+70+60	400+70	360+50+30	
4-10	410	410	210+200	280+150	250+170	280+80+50	280+90	<i>C. pararugosa</i>
25-09	500	500	250+250	300+110	200+100	400+70	200+120+70	<i>C. zemplinina</i>
53-11R	480	480	240+230	300+100+60	200+105+60	400	200+120+60+40	
81-11R	480	480	240+230	260+100	200+105+60	400	200+120+60+40	
141-11S	460	460	230+220	270+100+50	200+100+60	400	210+120+60	
53-11S	480	320+140	200+160+100	200+100+60+50	230+100+70+70	290+120	300+150	<i>C. valida</i>
114-11S	450	300+110	250+200	190+150+60+40	160+100+60+60	300+90	300+150	<i>C. ethanolica</i>
106-11R	450	300+80+50	250+200	180+160	160+100+60+60	300+90	300+150	
7-11R	750	480+120+90+80	380+370	420+320	310+270+150+130+90	700+50	220+190+70	<i>H. osmophila</i>
12-10	750	480+120+90+80	380+370	420+330	310+270+150+130+90	700+50	220+190+70	
111-10	750	710+40	380+370	420+280	270+150+130+100+100	690+50	220+190+70	<i>H. vineae</i>
127-09	750	750	350+200+160+70	300+170+140	310+310+100	540+170	240+120+90	<i>H. uvarum</i>
30-09	550	550	300+150+100	310+200	290+280	370+180	220+150+100+60	
38-10	750	750	350+190+160+60	400+170+130+50	320+320+100	540+170	240+120+90	
55-11R	750	750	340+200+160+50	400+180+140	320+320+110	520+170	250+120+110+90+80	
110-09	390	290+100	200+190	260+130	210+90+80	390	290	
156-09	650	650	280+130+110+50	350+230+70	300+220+100	380+110+90	420+70+50	<i>Sp. roseus</i>
44-11S	620	400+220	340+210	220+170+60+50	300+230+100	430+110	200+160+110	<i>Rh. mucilaginoso</i>
27-09	580	580	310+180+60	320+150	250+210	530	370+100	<i>Cr. flavescens</i>
29-09	520	520	310+180+30	300+150+50+20	260+200+60	540	380+90	
179-09	600	580	300+140+100	330+200+60	290+270	370+180	220+140+90	<i>B. albus</i>
94-09	580	450+150	290+140+100	140+130	190+170+(100)	380+200	230+150+90	
G4	680	300+200+90+90	350+330		310+290	680	210+120+90+80	<i>Kl. thermotolerans</i>
11-11R	580	580	290+290	250+200+120+60	280+195+70	420+90	540+40	<i>Z. florentinus</i>
14-09	880	320+240+180+140	370+120	300+280+140+100+60	410+370	800+80	220+180+120+100+90	<i>S. cerevisiae</i>
139-09	880	520+240+140+130	370+120	300+280+140+100+60	400+370+148	800+80	220+180+120+100+90	

Obř. 1: Ukázka vložení sekvenovaných druhů do internetově dostupné databáze.

Yarrowia lipolytica partial 26S rRNA gene, strain ZIM 2409, isolate BGAL3-Y57

GenBank HE660060.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS HE660060 867 bp DNA linear PLN 07-FEB-2012
 DEFINITION Yarrowia lipolytica partial 26S rRNA gene, strain ZIM 2409, isolate BGAL3-Y57.

ACCESSION HE660060

VERSION HE660060.1 GI:374843702

KEYWORDS .

SOURCE Yarrowia lipolytica

ORGANISM [Yarrowia lipolytica](#)
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;
 Saccharomycetes; Saccharomycetales; Dipodascaceae; Yarrowia.

REFERENCE 1

AUTHORS Cadez,N., Suranska,H., Golic,N., Kos,B., Suskovic,J.,
 Topisirovic,L. and Raspor,P.

TITLE Yeasts communities in artisanal cheeses of Western Balkan region

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 867)

AUTHORS Cadez,N.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (02-FEB-2012) to the INSDC. Biotechnical faculty,
 University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana,
 SLOVENIA

FEATURES

	Location/Qualifiers
source	1..867 /organism="Yarrowia lipolytica" /mol_type="genomic DNA" /strain="ZIM 2409" /isolate="BGAL3-Y57" /isolation_source="cheese" /db_xref="taxon:4952" /country="Serbia:South Moravska region, Aleksinac"
gene	<1..867 /gene="26S rRNA"
rRNA	<1..867 /gene="26S rRNA" /product="26S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

1 aaggatcatt attgatttta tctatttctg tggatttcta ttctattaca gcgtcaat
61 atctcaatta taactatcaa caacggatct cttggctctc acatcgatga agaacgcagc
121 gaaccgcgat attttttgtg acttgacgat gtgaatcacc aatctttgaa cgcacattgc
181 gcggtatgac attccgtacc gcacggatgg aggagcgtgt tccctctggg atcgcattgc
241 tttcttgaaa tggatttttt taaactctca attattacgt catttcacct ccttcacccg
301 agattaccgg ctgaacttaa gcatatcaat aagcggagga aaagaaacca acagggattg
361 cctcagtaac ggcgagttaa gcggcaaaag ctcaaatgg aaacctctgg gattgtaatt
421 tgaagatttg gcattggaga aagtaacacc aagttgcttg gaatagtagc tcatagaggg
481 tgacaacccc gtctggctaa ccgttctcca tgtattgctt tatcaaaagag tggattgtt
541 tgggaatgca gctcaaatgg ggtgtaaac tccatctaaa gctaaatact ggtgagagac
601 cgatagcgaa caagtactgt gaaggaaagg tgaagaaga ttgaaaaga gagtgaataa
661 gtatgtgaaa ttgttgatag ggaaggaaat gaggtagagc tggccgaggt ttcagccgcc
721 cctcgtgggc ggtgtactgc cgacgccgag tcacgatag cgagacgagg gttacaaatg
781 ggagcgcctt cgggctttct cccctaacc tccacactgc caccgacgac ataatccacc
841 catttcaccc gtcttgaac acggacc
    
```

//

Customize view

Analyze this sequence

[Run BLAST](#)

[Pick Primers](#)

[Highlight Sequence Features](#)

[Find in this Sequence](#)

LinkOut to external resources

[SILVA LSU Database](#)

[\[SILVA\]](#)

Related information

[Related Sequences](#)

[Taxonomy](#)

Recent activity

[Turn Off](#) [Clear](#)

Yarrowia lipolytica partial 26S rRNA gene, strain ZIM 2409, isolate BGAL3-Y57 [Nucleotide](#)

Pichia fermentans partial 26S rRNA gene, strain ZIM 2398, isolate BGLE1-Y1E [Nucleotide](#)

TPA_inf. Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XII, complete sequenc [Nucleotide](#)

[Nucleotide Sequence \(1100 letters\)](#)

[BLAST](#)

[Nucleotide Sequence \(1100 letters\)](#)

[BLAST](#)

[See more...](#)