

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

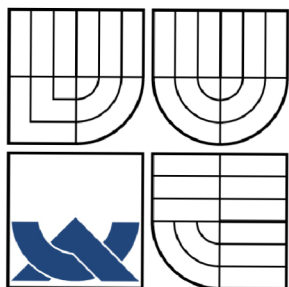
OPTIMALIZACE METODY PCR-RFLP PRO TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ
KVASINEK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

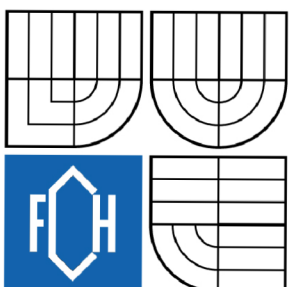
Bc. RADANA OLIVOVÁ

BRNO 2009



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

OPTIMALIZACE METODY PCR-RFLP PRO TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ KVASINEK

OPTIMALIZATION OF PCR-RFLP METHOD FOR TAXONOMY OF YEASTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

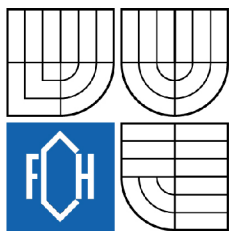
Bc. RADANA OLIVOVÁ

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0245/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Radana Olivová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Optimalizace metody PCR-RFLP pro taxonomické zařazení kvasinek

Zadání diplomové práce:

1. Vypracování literární rešerše na dané téma
2. Výběr metod pro experimentální část a jejich aplikace
3. Zpracování výsledků, diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Radana Olivová
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá optimalizací metody PCR – RFLP pro taxonomické zařazení kvasinek. Konvenční metody pro identifikaci kvasinek jsou časově náročné. Molekulárně biologické metody založené na PCR slouží k rychlé a precizní identifikaci v porovnání s tradičními fenotypovými metodami.

V této práci byla použita molekulárně biologická metoda PCR – RFLP, která bere v úvahu, že v ribozomální DNA kvasinek se opakují konzervativní nekódující oblasti (tzv. spacers), jež jsou charakteristické pro každý druh i kmen. Pomocí PCR se amplifikovaly specifické úseky DNA, které byly štěpeny restriktivními endonukleázami a získané fragmenty jsou identifikovány pomocí horizontální elektroforézy.

V literární rešerši jsou zpracovány informace o kvasinkách, jejich taxonomii a molekulárně biologických metodách.

ABSTRACT

This thesis deal with optimization method PCR – RFLP for taxonomy enlistment of yeasts. Conventional identification methods for yeasts are time-consuming. Molecular biological method based on PCR are instrumental towards fast and precise identification as compared to conventional phenotypic methods.

In this thesis molecular biological method PCR – RFLP was used for identification and enlistment of yeasts. This method follow repeating spacers of ribosomal DNA of yeast, characteristic for each species and strain. By the help of PCR were amplified specific partitions of DNA. These fragments of DNA were split by restriction endonucleases and identified by horizontal electroforesis.

In background of this thesis there are information about yeasts, their taxonomy and molecular biological methods.

KLÍČOVÁ SLOVA

kvasinky, identifikace, taxonomie, optimalizace, DNA, PCR-RFLP

KEYWORDS

yeasts, identification, taxonomy, optimization, DNA, PCR-RFLP

OLIVOVÁ, R. *Optimalizace metody PCR-RFLP pro taxonomické zařazení kvasinek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 92 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto děkuji Mgr. D. Vránové Ph. D. za odborné vedení a všestrannou pomoc při realizaci této diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. Kvasinky.....	9
2.1.1. Morfologie.....	9
2.1.2. Cytologie.....	10
2.1.2.1. Buněčná stěna.....	10
2.1.2.2. Cytoplazmatická membrána.....	10
2.1.2.3. Cytoplazma.....	11
2.1.2.4. Jádro.....	11
2.1.3. Rozmnožování.....	12
2.1.3.1. Vegetativní rozmnožování.....	12
2.1.3.2. Pohlavní rozmnožování.....	13
2.1.3.3. Ascomycetes –tvorba spor.....	14
2.1.3.4. Basidiomycetes –tvorba spor.....	14
2.1.4. Způsoby kultivace kvasinek.....	15
2.1.5. Izolace mikroorganismů.....	15
2.1.6. Uchovávání kultur.....	15
2.1.6.1. Metody založené na omezení metabolismu.....	16
2.1.6.2. Metody vysušování kultur.....	16
2.1.6.3. Metody uchovávání při velmi nízkých teplotách.....	16
2.1.7. Význam kyseliny pyrohroznové v metabolických procesech kvasinek.....	17
2.1.7.1. Glykolýza.....	17
2.1.7.2. Etanolvá fermentace.....	18
2.1.7.3. Fermentace oligosacharidů.....	19
2.1.7.4. Vztah mezi dýcháním a kvašením.....	20
2.1.8. Taxonomie kvasinek.....	21
2.1.8.1. Význam taxonomie pro vědu a praxi.....	22
2.1.8.2. Zařazení rodů kvasinek do třídy Ascomycetes.....	23
2.1.8.3. Rod Hanseniaspora (imperfektní stadium Kloeckera).....	23
2.1.8.4. Rod Pichia.....	24
2.1.8.5. Rod Kluyveromyces.....	24
2.1.8.6. Rod Saccharomyces.....	25
2.1.8.7. Zařazení rodů kvasinek do třídy Basidiomycetes.....	26
2.1.8.8. Rod Rhodotorula.....	26
2.1.8.9. Rod Rhodosporidium.....	27
2.1.8.10. Rod Sporidiobolus.....	27
2.1.9. Význam kvasinek při výrobě vína.....	28
2.1.9.1. Přírodní naleziště.....	28
2.2. Nukleové kyseliny.....	29
2.2.1. Složení a struktura DNA a RNA.....	29
2.2.2. Struktura dvoušroubovicové DNA.....	30
2.2.3. Různé strukturní formy DNA.....	31
2.2.4. Replikace – biosyntéza DNA.....	31
2.2.4.1. Enzymy v biosyntéze DNA.....	31
2.2.4.2. Mechanismus replikace.....	32
2.3. Amplifikace DNA in vitro pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).....	33
2.3.1. Princip PCR.....	33
2.3.2. Komponenty PCR směsi.....	35
2.3.2.1. Primery.....	35

2.3.2.2.	Termostabilní DNA-polymerázy.....	35
2.3.2.3.	Hořčnaté ionty	36
2.3.2.4.	Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP)	36
2.3.3.	Aplikace PCR.....	36
2.4.	Modifikace PCR.....	37
2.4.1.	Restrikční analýzy	37
2.4.1.1.	Restrikční endonukleázy	37
2.4.1.2.	Metody používané k identifikaci kvasinek.....	38
2.4.1.3.	PCR-RFLP (stanovení polymorfizmu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR).....	39
2.5.	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	40
3.	PRAKTICKÁ ČÁST.....	41
3.1.	Chemikálie, přístroje, suroviny	41
3.1.1.	Chemikálie	41
3.1.2.	Přístroje, zařízení.....	41
3.1.3.	Suroviny	41
3.2.	Příprava pracovních roztoků a chemikálií.....	41
3.2.1.	Postup přípravy délkových standardů (20 bp, 100 bp, 100 bp Plus).....	41
3.2.2.	Příprava Tris-borátového pufru (TBE).....	42
3.2.2.1.	Příprava zásobního roztoku 10×TBE	42
3.2.2.2.	Příprava pracovního roztoku 1×TBE s ethidium bromidem	42
3.2.2.3.	Příprava pracovního roztoku 1×TBE bez ethidium bromidu.....	42
3.2.3.	Příprava ethidium bromidu.....	42
3.2.4.	Příprava 0,7 % agarosového gelu.....	42
3.2.5.	Příprava 2 % agarosového gelu.....	43
3.2.5.1.	Příprava octanového pufru	43
3.3.	Očkování a kultivace kvasinek.....	43
3.4.	Izolace kvasinek pomocí zředovací metody	43
3.5.	Izolace kvasinkové DNA	43
3.6.	Amplifikace kvasinkové DNA pomocí PCR	44
3.6.1.	Program pro amplifikaci DNA.....	44
3.6.2.	Detekce PCR produktů pomocí elektroforézy	44
3.7.	Přečištění PCR produktů	45
3.8.	Restrikční analýza PCR produktů	45
3.8.1.	Detekce restrikčních fragmentů pomocí elektroforézy	46
3.9.	Analýza vlivu různých koncentrací Mg ²⁺ na specifitu PCR	46
3.10.	Optimalizace koncentrace DNA pro PCR.....	47
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
4.1.	Koncentrace vyizolované DNA	48
4.2.	Amplifikace kvasinkové DNA pomocí metody PCR	48
4.3.	Vyhodnocení výsledků PCR-RFLP	50
4.3.1.	Restrikční analýza pomocí endonukleázy HinfI	51
4.3.2.	Restrikční analýza pomocí endonukleázy HaeIII.....	54
4.3.3.	Restrikční analýza pomocí endonukleázy TaqI	57
4.3.4.	Restrikční analýza pomocí endonukleázy HhaI.....	60
4.3.5.	Restrikční analýza pomocí endonukleázy HpaII.....	63
4.3.6.	Restrikční analýza pomocí endonukleázy MseI.....	66
4.3.7.	Restrikční analýza pomocí endonukleázy AluI.....	68
4.3.8.	Zhodnocení výsledků restrikční analýzy.....	70
4.3.9.	Dendrogramy.....	71

4.4.	Vyhodnocení optimalizace metody PCR-RFLP	75
4.4.1.	Analýza vlivu různých koncentrací Mg^{2+} na specifičnost PCR.....	75
4.4.2.	Optimalizace koncentrace DNA pro PCR.....	78
5.	ZÁVĚR.....	79

1. ÚVOD

Kvasinky jsou heterotrofní jednobuněčné eukaryotní mikroorganismy, které dostaly český název podle schopnosti většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý.

Kvasinky se uplatňují v klasickém kvasném průmyslu při výrobě piva a vína dále pekařského i krmného droždí. Získávají se z nich v menší míře biologicky aktivní látky, jako např. různé enzymy, vitamíny, sploidy jejich metabolismu atd. Snadno se pěstují v kulturách *in vitro*, a proto se používají jako modely ve vědě. *Saccharomyces cerevisiae* je nejčastěji používaným modelem v makromolekulové biologii, genetice i v genovém inženýrství a jinde.

Kvasinky i kvasinkové mikroorganismy jsou také škůdci kvasných procesů a potravinářských výrob. Jsou důvodem onemocnění lidí i zvířat. Proto je velice důležité je odhalit, charakterizovat a zjistit i míru jejich škodlivosti.

Taxonomie se zabývá identifikací a popisem jednotlivých druhů kvasinek a jejich zařazením do skupin podle příbuznosti.

Konvenční identifikační metody kvasinek, založené na morfologických, fyziologických, biochemických a genetických charakteristikách jsou časově náročné. Je nezbytné provést 50 až 100 fenotypových testů k identifikaci kvasinek na úrovni druhů.

Mezi molekulárně biologické metody založené na PCR, které slouží k identifikaci kvasinek a k jejich zařazení na druhové nebo kmenové úrovni patří RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Tato metoda se vyznačuje rychlou a precizní identifikací kvasinek v porovnání s tradičními fenotypovými metodami.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kvasinky

Pojmem kvasinky jsou označovány heterotrofní eukaryotní jednobuněčné mikroorganismy, které pučí nebo se dělí přehrádkami a vytvářejí na tuhých živných médiích nejčastěji askogenní kolonie. Český název dostaly pro schopnost většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy i trisacharidy na ethanol a oxid uhličitý. Do skupiny kvasinkových mikroorganismů se zařazují druhy, tvořící podobné kolonie jako kvasinky, ale kromě jednotlivých pučících buněk jsou schopny vytvořit i různé typy filamentů tj. nepravé i pravé hyfy, které většinou nevytvářejí spory. Kvasinky se řadí mezi houby (Fungi). [1, 2]

2.1.1. Morfologie

Velikost buněk kvasinek je pod hranicí viditelnosti okem a proto je pozorujeme mikroskopem. Základním tvarem buněk kvasinek je rotační elipsoid. Jinak se vyskytují tvary kulaté, oválné, elipsoidní, citronovité, ogivální, lahvovité, podlouhlé, vláknité (obr.1). Při stejných podmínkách kultivace, existuje určitá variabilita rozměrů buněk v rámci druhů a ještě větší v rámci rodů. Přeměna tvarů buněk nastává pod vlivem vnějších podmínek a úzce souvisí s vlastní funkcí buněk.

Kvasinkové mikroorganismy mohou měnit svůj tvar i během vývoje. Buňka přenesená do nového živného prostředí si musí nejprve zvyknout na nové podmínky a načerpat látky, aby si udělala zásobu energie pro rozmnožování. V buňce se odehrávají složité biochemické procesy. Buňka zvětšuje svoje rozměry, nejdříve její délku. Na konci tohoto stádia vývoje je nejprodlouženější. Když nastane bujné rozmnožování, buňky se oddělují od mateřské buňky dříve než dorostly. Přitom se většinou zmenšují a zakulacují. Když rozmnožování pomalu ustává, tak buňky začínají růst do větších rozměrů, vyrovnávají se tvarem a velikostí původním buňkám. [2, 4, 13]

Některé rody nebo kmeny kvasinek vytvářejí protáhlé buňky, pučící pouze na pólech a které po pučení zůstávají spojeny v dlouhá zaškrčená vlákna – tzv.pseudomycelium. V určitých místech pseudomycelia se tvoří zhluky kulatých nebo elipsoidních buněk – tzv. blastospory. Bývají zeskupené do chumáčovitých, přeslenovitých nebo nepravidelně větvených tvarů. Některé rody nebo kmeny kvasinek tvoří pravé mycelium, tj. vlákno vznikající příčným dělením protáhlých buněk. Na myceliu vznikají podobné svazky blastospor jako na pseudomyceliu. [1, 2, 3, 4]

V taxonomii se rozměry buněk nejčastěji vyjadřují pomocí variačního rozpětí, od nejmenšího po největší, výběr se dělá přibližně z určitého počtu buněk. V minulosti bylo v taxonomii období, kdy se takto určeným rozměrům buněk připisovala vážnost taxonomického znaku. Později se dokázalo, že není možné posuzovat tvary a rozměry buněk bez závislosti na prostředí, v kterém buňky žijí a bez zohlednění fáze růstu populace. [3]



Obrázek č. 1: Tvary buněk kvasinek [2]

- a) kulaté, b) oválné, elipsoidní, c) citronovité, d) ogivální,
e) lahvovité, f) podlouhlé, g) vláknité

2.1.2. Cytologie

V průběhu vývoje vědeckého výzkumu se názor na buňku kvasinek podstatně změnil. Zapříčinil to rozvoj metod elektronové mikroskopie. Buňka se považuje za vícefázový systém, v kterém membrány ohraničují jednotlivé reakční prostory, kompartmenty. Vegetativní kvasinková buňka je složena ze silné a pevné buněčné stěny, jemné cytoplazmatické membrány, cytoplazmy, jež obsahuje řadu membránových struktur, a jádra, které je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou (obr.2). Pohybové orgány, tj. bičíky, vegetativní buňky kvasinek nemají. Některé rody kvasinek tvoří pohlavní spory, které mají fyziologické vlastnosti odlišné od vlastností endospor bakterií. [1, 4, 6, 13, 24]

2.1.2.1. Buněčná stěna

Buněčná stěna kvasinek má silnou a pevnou strukturu, která dává buňce tvar a chrání ji před mechanickými vlivy a před osmotickým šokem. Velkými póry stěny volně procházejí všechny sloučeniny kromě sloučenin vysokomolekulárních, jako jsou polysacharidy a bílkoviny.

Hlavní složkou buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy, které tvoří 80 % sušiny stěny. Mají strukturu vláken, která tvoří hustou a pevnou spleť. Tato spleť je vyplněna bílkovinami, které tvoří 6 až 10 % sušiny stěny. Ve stěně kvasinek je také přítomno malé množství lipidů a fosfolipidů (3 až 10 %) a také fosforečnany, vázané esterovými vazbami na polysacharidy. Tyto fosfátové zbytky spolu se skupinami $-COOH$ bílkovin dávají buňkám kvasinek negativní náboj, který ovlivňuje adsorpci látek z živného prostředí.

Na povrchu stěny kvasinek můžeme pozorovat jizvy po pučení. Na jednom pólu každé buňky můžeme vidět zvláštní jizvu, která zůstala v místě dřívějšího spojení buňky s mateřskou buňkou. Je to tzv. jizva zrodu. Elipsoidní buňky rodu *Saccharomyces* nepučí nikdy opakovaně na stejném místě, takže počet jizev nám určuje i stáří buňky.

Některé druhy kvasinek (hlavně příslušníci rodu *Cryptococcus*), tvoří kolem svých buněk ještě polysacharidové obaly ve formě pouzder.

Stěnu kvasinek můžeme rozložit působením enzymů trávicího traktu hlemýžďe *Helix pomatia* nebo enzymů získaných z některých bakterií. [1, 13, 24]

2.1.2.2. Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána kvasinek, nazývaná také plazmalema je poměrně tenká a skládá se z lipidů a proteinů. Vytváří četné vychlípeniny, které vybíhají do cytoplazmy. Plazmalema má tři hlavní funkce:

- a) tvoří elastický obal a ochrannou bariéru na povrchu buňky,
- b) kontroluje vstup a výstup látek do buňky a z buňky,
- c) je místem, kde se odehrává biosyntéza některých komponentů buněčné stěny a vnějších obalů.

V cytoplazmatické membráně neprobíhají oxidační reakce, ale má silnou aktivitu ATPázy, která se označuje jako Mg-ATPáza. [1, 4]

2.1.2.3. *Cytoplazma*

Cytoplazma mladých buněk kvasinek se ve světelném mikroskopu jeví jako průhledná, homogenní hmota a u starších buněk se objevují zrníčka a jemná nebo větší vakuolizace. Cytoplazma kvasinek obsahuje systém dvojité membrány, jež se nazývá endoplazmatické retikulum. Obě tyto membrány mají velké póry a vzhledově připomínají membránu jádra. Vnitřní povrch membrány je hladký a v porovnání s vnějším zrnitým povrchem je labilnější k autolýze a fixaci. Na vnějším povrchu obou membrán jsou zrníčka polyzomů (agregátů ribozomů). Endoplazmatické retikulum je místo syntézy peptidů a bílkovin. [1, 4, 13]

V cytoplazmě kvasinek jsou přítomny mitochondrie. Jsou to strukturální útvary, které mají velice rozmanité tvary (kulovité, válcovité, vláknité, laločnaté). Jsou obklopeny dvěma membránami: vnější membrána se vyznačuje bradavičnatým povrchem, vnitřní membrána tvoří vchlípeniny směrem dovnitř mitochondrie, tzv. krysty. Mitochondrie jsou složeny z bílkovin, lipidů a fosfolipidů, také obsahují RNA a DNA. Jsou sídlem dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace. Dále obsahují tRNA, mRNA a ribozomy, neboť v mitochondriích probíhá syntéza mitochondriálních bílkovin. [1, 24]

Vakuoly jsou velmi nápadné a důležité orgány v buňkách kvasinek. Zpravidla bývá v buňce jedna velká vakuola, nejčastěji kulatá a několik malých vakuol. Průměr vakuol bývá rozličný od 0,3 do 3 nm. Ohraničené jsou jednotkovou membránou – tonoplastem (vakuolovou membránou). [4]

Vakuola obsahuje roztok propouštějící světlo, a tak má ve světelném mikroskopu stejný odstín jako pozadí zorného pole (odtud pochází i její název, lat. *vacuus* znamená prázdný). Uvnitř vakuol jsou uloženy hydrolytické enzymy, jako proteinasy, ribonukleasa a esterasa. Kromě toho obsahují vakuoly ještě polyfosfáty, draselné ionty, aminokyseliny a puriny, takže jsou rezervoárem látek, jež se právě neúčastní metabolismu. [1]

Golgiho aparát má tvar plochého měchýřku nebo několika propojených plochých měchýřků anebo cisteren uložených rovnoběžně vedle sebe. Funkcí tohoto aparátu je transportovat prekurzory buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu.

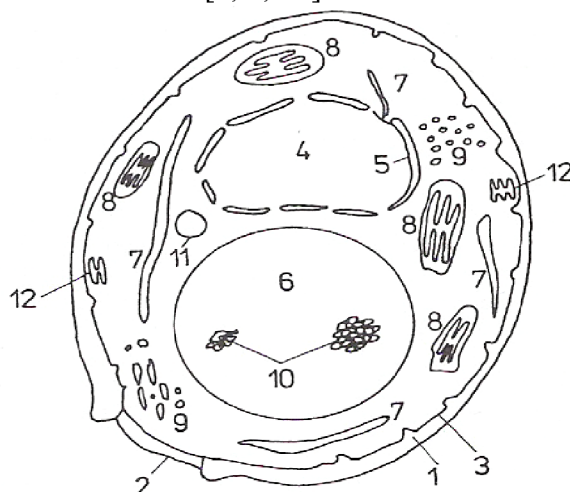
Kvasinky obsahují také cytoskelet, což je síť proteinových vláken, rozprostřená v cytoplazmě i v jádře. V cytoskeletu kvasinek hrají významnou roli mikrotubuly, což jsou málo ohebné trubice složené z tubulinu. Každá molekula tubulinu obsahuje guanosintrifosfát.

V cytoplazmě kvasinek se dále nacházejí zrníčka rezervních látek, především volutinu a glykogenu. Ostatní složky cytoplazmy jsou ribozomy, ribonukleové kyseliny, nukleotidy, meziprodukty metabolismu včetně některých vitamínů a zásoby aminokyselin a také některé anorganické ionty. [1, 4]

2.1.2.4. *Jádro*

Jádro kvasinek je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry a je umístěno přibližně ve středu buňky. Rozlišení chromozomů v jádře kvasinek je i pomocí elektronové mikroskopie tenkých řezů buněk velice obtížné, proto počet chromozomů byl odvozován z výsledků genetických studií. Určitý úsek DNA chromozomu hraje roli při dělení chromozomů a jejich segregaci během dělení jádra. Tento úsek se nazývá centroméra. V koncových úsecích chromozomu, tzv. telomérách se vyskytují příčné vazby mezi dvěma řetězci DNA. Kvasinkové chromozomy obsahují chromatin, který se skládá z nukleozomálních histonů H2A, H2B, H3, H4.

V jádru kvasinek je jadérko srpkovitého tvaru, které je umístěné těsně pod jadernou membránou. Dále se zde vyskytuje pólové tělíčko vřetenka. Má tvar disku a vycházejí z něj mikrotubuly, které jsou složeny z tubulinu. [1, 4, 24]



Obrázek č. 2: Schéma průřezu buňkou kvasinek [1]

- 1) buněčná stěna, 2) jizva zrodu, 3) cytoplazmatická membrána, 4) jádro,
5) jaderná membrána, 6) vakuola, 7) endoplazmatické retikulum, 8) mitochondrie,
9) glykogen, 10) polymetefosfát, 11) lipidy, 12) Golgiho aparát.

2.1.3. Rozmnožování

Většina kvasinek se rozmnožuje pučením buněk, jsou i kvasinky, které se rozmnožují jednoduchým zaškrcením, dělením např. zástupci rodu *Schizosaccharomyces*. Jiné skupiny vytvářejí pravé mycelium nebo pseudomycelium. Vedle vegetativního rozmnožování je u většiny kvasinek znám pohlavní způsob rozmnožování. Výsledkem pohlavního rozmnožování jsou pohlavní spory. Většina kvasinek tvoří jako pohlavní spory – askospory, což jsou endospory umístěné ve vřecku (asku). Tyto kvasinky řadíme mezi Ascomycotina. Některé rody kvasinek tvoří pohlavní exospory, tj. spory umístěné vně sporotvorných buněk. Tyto rody řadíme mezi Basidiomycotina. [1, 2, 13]

2.1.3.1. Vegetativní rozmnožování

Většina rodů kvasinek se vegetativně (asexuálně) rozmnožuje pučením. Při pučení je vznikající malá dceřiná buňka spojena kanálkem s mateřskou buňkou. Před vlastním pučením dochází ke splynutí membrán endoplazmatického retikula a pak dochází k jeho oddělení, děle k opakovanému dělení vakuol a ke změně tvaru mitochondrií v dlouze protáhlé. Po počátku tvorby pupenu do něho vstupují drobné vakuoly a mitochondrie. Současně začne mitotické dělení jádra a jeho migrace k pupenu. [1, 3]

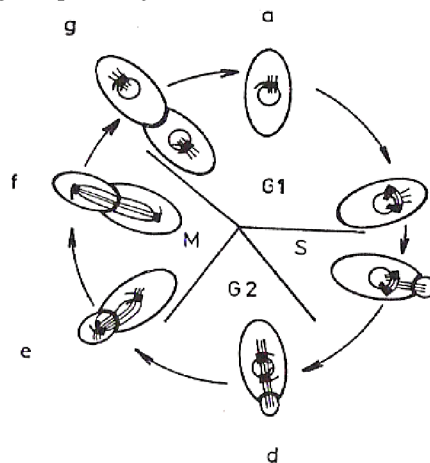
Mitotické dělení jádra je rozděleno na pět stádií: (1) během profáze dochází ke kondenzaci zreplikovaných chromosomů a vně jádra začíná vznikat mitotické vřetenko, (2) v prometafázi se rozpadá jaderný obal, což umožňuje navázání chromosomů na mikrotubuly vřetenka, (3) v metafázi se všechny chromosomy shromáždí v centru mitotického vřetenka – v jeho ekvatoriální rovině, (4) během anafáze se obě sesterské chromatidy od sebe synchronizovaně oddělují a jsou taženy mitotickým vřetenkem k opačným pólům buňky, (5)

v telofázi se znovu vytváří jaderný obal, který je kolem každé sady chromosomů za vzniku dvou jader. [4, 7, 11]

S jádrem přecházejí do nově vzniklého pupenu také další složky cytoplazmy. Pak se cytoplazmatickou membránou uzavře kanálek mezi mateřskou a dceřinou buňkou a v pupenu se intenzivně syntetizuje a rozšiřuje endoplazmatické retikulum. Po vytvoření buněčné stěny mezi mateřskou a dceřinou buňkou, vzrůstu velikosti pupenu a spojení drobných vakuol ve vakuolu jedinou je pučení ukončeno. Většinou se dorostlá dceřiná buňka od buňky mateřské ihned oddělí. V některých případech však buňky zůstanou spojeny i po několikerém dělení a vytvoří tzv. buněčné svazky. Celý cyklus buněčného dělení od vzniku zřetelného drobného pupenu až po oddělení dceřiné buňky trvá za optimálních růstových podmínek kolem dvou hodin. [1, 24]

Celý cyklus buněčného dělení je rozdělen do čtyř fází: (1) G1-fáze, kdy je v haploidní buňce každý gen jenom jednou, (2) S-fáze, v této fázi dochází k syntéze chromozomální DNA a k vytvoření dvou chromatid z jednoho chromozomu, (3) G2-fáze, zde je replikace chromozomální DNA ukončena, (4) M-fáze, v této fázi probíhá mitóza. [1, 7, 11]

Cyklus buněčného dělení je u *Saccharomyces cerevisiae* (obr.3) pod kontrolou stovky genů. Tyto geny byly většinou označeny CDC a jejich teplotně senzitivní mutanty umožnily studium kontroly tohoto cyklu a jeho regulace. Některé CDC geny však kódují složení enzymů, které jsou důležité i pro jiné procesy v buňce. [1, 24]



Obrázek č. 3: Schéma buněčného dělení u *Saccharomyces cerevisiae* [1]

S – syntéza DNA, M – mitóza, G1 – v buňce je základní genetický materiál (jeden genom), G2 – buňka obsahuje zdvojený genom, a – klidová buňka, b – zdvojení polárního tělíska, c – syntéza DNA, vznik malého pupenu, d – separace polárního tělíska a vznik vřeténka, e, f – migrace jadra do pupenu a dělení jadra (mitóza), g – vznik dvou samostatných jader, oddělení obou buněk.[1]

2.1.3.2. Pohlavní rozmnožování

Sexuální reprodukce je známá u teleomorfních (perfektních) druhů, které patří mezi *Ascomycotina* a *Basidiomycotina*.

Pohlavní rozmnožování je charakterizováno spájením dvou haploidních buněk neboli konjugací a spájením jejich jader čili karyogamií za vzniku diploidního jadra. Dále se diploidní jádro dělí meiózou na čtyři haploidní jádra, jež jsou základem pohlavních spor, nebo se dělí další mitózou a pak vzniknou spory. V životním cyklu kvasinek se pravidelně střídá haploidní a diploidní fáze kvasinek. [1, 3, 24]

Meioza je speciální typ buněčného dělení, ve kterém se počet chromozomů naprosto přesně sníží na polovinu. Meioza pochází z řeckého slova pro zmenšení. Ačkoliv je většina mechanických rysů meiozy podobná mitotickým, chování chromosomů je odlišné. Výsledkem dvou následných meiotických dělení jsou čtyři geneticky rozdílné haploidní buňky, zatímco mitózou vznikají dvě geneticky identické buňky jediným dělením. [4, 7, 11, 13]

2.1.3.3. *Ascomycetes – tvorba spor*

Tvorba asků se sporama nemusí nastat vždy jen po předcházejícím spárování opozitních typů. Během vývoje kvasinek stále přibývají další druhy, které vytvářejí spory partenogeneticky (izogamně nebo autogamně). Izogamní konjugace znamená, že konjugují dvě pohlavně nezávislé haploidní buňky a o autogamní tvorbě asků mluvíme tehdy, když diploidní buňky přecházejí přímo do asků. Poměrně často se u kvasinek vyskytuje heterogamní konjugace, jde o spájení velké buňky s malou, tedy např. mateřské buňky s dceřinou.

Kultury, které vytvářejí asky se sporama jen po předcházejícím spárování opozitních typů, jsou heterothalické. Kultury, které vytvářejí spory po předcházejícím spárování nezávislých buněk nebo monosporické kultury po předcházející mutaci párovacího typu, nebo autogamně sporulující diploidní kultury, jsou homothalické. [1, 3, 4]

Spory kvasinek jsou světlolomná tělíška pravidelných tvarů, takže je možné je pozorovat bez obarvení pomocí speciálních barvicích technik. Tvar askospor je nejčastěji kulovitý až elipsoidní, dále ledvinovitý, srpkovitý, kloboukovitý, saturnovitý, nebo vřetenovitý až jehlicovitý. Povrch askospor je hladký nebo zvrásněný až bradavčitý. Rod *Saccharomyces* má kulovité nebo mírně elipsoidní a hladké spory. V některých rodech mohou mít asky přívěsky na jedné nebo obou stranách, např. *Pichia* nebo *Debaryomyces*. Uvolněné spory z asků některých rodů aglutinují, a tak tvoří početné shluky, např. *Kluyveromyces*, *Pichia*. [1, 3, 13]

2.1.3.4. *Basidiomycetes – tvorba spor*

Morfologická různorodost sexuálně se rozmnožujících kvasinek je důsledkem realizace jejich životních cyklů. Životní cyklus se definuje jako střídání sexuálních a asexuálních stádií mezi jednou a následující tvorbou spor. U některých druhů rodu *Rhodospidium* se vyskytuje čtvero pohlaví. Dvě kombinace uskutečňují kompletní životní cyklus, dvě vytvářejí jen zygotu a rudimentární mycelium. Kompletní životní cyklus se odehrává tak, že po spárování vznikne zygota a z ní dikaryotické mycelium s přezkami, popřípadě i s vegetativními endokonídiemi, které můžeme poznat i v jiných rodech, např. *Aureobasidium*. Na dikaryotickém myceliu se vytvářejí teliospory, v kterých probíhá meioza. Teliospora vyklíčí na promycelium, z kterého vznikají sporidie, které pučí na vegetativní haploidní buňky různého pohlaví. Když se karyogamie a meioza odehrávají v jedné a té samé struktúře, nazývá se tento případ danžardinie. Když se zygoty i karyogamie vytvářejí naráz, mluvíme o syngamii. [3, 4]

Vyskytují se také kvasinky, které tvoří pohlavní haploidní exospory vnikající z protáhlé buňky zvané bazidie. Tyto pohlavní spory se nazývají bazidiospory. U rodu *Filobasidium* vzniká na polokulovitém konci bazidie 8 přisedlých bazidiospor, kdežto u rodu *Filobasidiella* se ze čtyř míst vrcholu bazidie bazipetálně tvoří čtyři řetízky bazidiospor. [1]

2.1.4. Způsoby kultivace kvasinek

Kvasinky se kultivují zpravidla při teplotě 25 °C až 28 °C, jiné rostou lépe při teplotě 20°C nebo 37 °C. Nejnižší teplota při které kvasinky mohou růst je 4 až 5 °C, nejvyšší 40 °C. V kapalném médiu se jejich růst projeví zákalem. Když při svém rozmnožování potřebují větší množství kyslíku, projeví se to slizovitou vrstvou – mázdrou. Jindy se vyskytuje jen kožka na povrchu tekutiny, která se může zachytávat i na stěnách nádoby spolu se zbytky živné tekutiny. Pokud nepotřebují mnoho kyslíku, tvoří se na povrchu prsteneček nebo ostrůvky mázdry.

Ke kultivaci kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů používáme nejčastěji sladinu jako kapalná živné médium a sladinový agar nebo sladinovou želatinu jako tuhé živné médium. [2, 8]

2.1.5. Izolace mikroorganismů

V každém typu životního prostředí se vyskytuje mikrobiální populace, skládající se z mnoha rozličných mikroorganismů. Oddělení jednoho taxonomického druhu z takové směsi mikroorganismů se nazývá izolace.

Populace mikroorganismů rostoucích na kultivačním médiu se nazývá kultura. Většina kultur získaná přímo z prostředí se skládá z několika druhů mikroorganismů, je to smíšená kultura. Izolace a nahromadění žádaného mikroorganismu nebo skupiny mikroorganismů ze smíšené populace se uskutečňuje pomocí nahromadění techniky, která spočívá v izolaci a kultivaci mikroorganismů (kvasinek), které byli v určitém vychodiskovém materiálu v menšině. Potlačí se růst všech organismů s výjimkou požadovaného.

Kromě získání čisté kultury z přirozeného materiálu, používáme izolaci při čištění kontaminovaných kultur, při získávání buněk požadovaných vlastností z dané kultury mikroorganismů nebo při určování nežádoucích mikroorganismů v potravinářských výrobcích, ve vodě, v půdě.

Obyčejně izolujeme mikroorganismy postupným zředěvacím způsobem, aby kolonie vzniklé rozmnožováním vyrostly pokud možno z jedné buňky. Základní izolační techniky:

- izolace křížovým roztěrem: způsob izolace spočívá v postupném vyředování původního vzorku na agarové plotny za pomoci očkovací kličky, tak aby na konci vyrůstaly jednotlivé kolonie,
- izolace roztěrem: naředí se suspenze buněk na vhodnou koncentraci ve sterilní vodě nebo ve fyziologickém roztoku a nanese se na živné médium a rozetře se pomocí Drigalského tyčinky po celém povrchu agarové plotny,
- izolace litím desek: Mikrobní směs je rozmíchána do roztavené živné půdy a postupně zředěvána do dalších půd, z nichž se litím připravují desky. [2, 8, 14]

2.1.6. Uchovávání kultur

Produkční kultury, porovnávací kmeny na určování nebo některé izoláty ze šlechtění nebo sanitačních zásahů atd. je potřeba udržet při životě. Stálé přeočkování stojí hodně času a také vlastnosti kmenů se mění tím rychleji, čím častěji kmeny přeočkujeme. Proto používáme metody na udržení kultur, tak aby kultury zůstaly dlouho životaschopné bez toho, že by je bylo potřeba stále přeočkovávat. Existuje víc způsobů, jak to dosáhnout, ale ani jedna z metod není univerzální. [8]

2.1.6.1. Metody založené na omezení metabolismu

Snížení metabolismu se dosahuje různým způsobem, např. pěstování agarových kultur při 4 °C, uchovávání v destilované vodě, v 10 % roztoku sacharózy, zalitím kultur sterilním parafinovým olejem, atd.

Nejjednodušším a velmi dobrým způsobem uchování je zalití kultur sterilním parafinovým olejem. Zalívají se dobře narostlé, ale mladé kultury tak, aby vrstva parafinového oleje byla vyšší o 1 cm jako konec šikmého agaru. Je dokázané, že sporotvorné, ale i imperfektní kvasinky vydrží při životě pod olejem 10 i více roků. [8]

2.1.6.2. Metody vysušování kultur

Vysušování kultur je velmi rozšířená metoda. Musí probíhat rychle a zpravidla za přítomnosti ochranné látky. Takový způsob uchování kultur je adsorpce na různé látky, nosiče, např. na silikagel, písek, síťované makromolekuly atd.

Je známá celá řada podobných metod, jako je vysušování ve vakuu, metoda předsušených zátek, želatinových disků apod.

Nejpoužívanější způsob uchování kultur je lyofilizace. Princip tohoto druhu vysušování je v odnímání vody ze zmrznutých kultur ve vakuu. Kultura rozsuspendovaná v roztoku má volnou vodu a vodu vázanou v buňkách. Odstraňuje se jen volná voda, voda vázaná v buňkách musí zůstat, aby se struktura buněk neporušila. Volná voda se odstraňuje sublimací jako pára. Sublimovaná voda se může odstranit chemicky adsorpcí na hygroskopické látky (oxid fosforečný). Může se však odstranit kondenzací par v kondenzátorech, které jsou chlazené na nižší teplotu, než při které probíhá vysušování. Na chlazení se používá tuhý oxid uhličitý nebo kapalný dusík. Vákuum, které se přitom používá, musí dosahovat 1 až 15 Pa.

Na lyofilizaci se používají speciální ampulky a ty se plní rezervačním prostředím, kterým může být mléko nebo směs 10 % agarózy, 1,5 % želatiny a 0,1 % agaru. Rezervační prostředí má mimořádný význam na udržení organismu naživu a na to, aby se mohl snadno znovu vykultivovat.

Lyofilizované kultury se rekultivují tak, že se ampulka nařeže ve středu vatové zátky po celém obvodu a přiloží se do červena rozpálený zahnutý drát. Po rozlomení ampulky se vnese 0,5 ml sterilní živné půdy a zátky se vymění za novou sterilní zátku. Inkubuje se při optimální teplotě. [8]

2.1.6.3. Metody uchovávání při velmi nízkých teplotách

Na dosažení velmi nízkých teplot se používá stekucený plyn: vzduch, methan, kyslík, oxid uhličitý (-83 °C), dusík (-196 °C), argon, hélium (-200 °C), přirozený plyn apod. Ultranízká teplota, která se docílí kapalným dusíkem, je vhodná na údržbu kvasinek, bakterií apod.

Kultury se připravují podobně jako na lyofilizaci. Kultury ze šikmého sladinného agaru se přeočkují na sladinný agar v Petriho miskách a po 3 až 4 dnech inkubace při optimální teplotě se očkují do Parkerova prostředí (2,5 % sladový extrakt, 15 % inaktivního telecího séra, 10 % dimethylsulfoxidu). Plní se do ampulek po 0,5 ml. Ampulky se uzavírají teplem a umísťují se do velkých nádob (např. Dewarova nádoba).

Před rekultivací se ampulka vybere, bezprostředně se umístí do vodní lázně o 37 °C a po rozmrazení se sterilně otevře. Obsah se vnese do připravené plnohodnotné půdy. Inkubuje

se při optimální teplotě. Kvasinky uchovávané tímto způsobem přežívají 5 – 10 roků bez problémů. [8]

2.1.7. Význam kyseliny pyrohroznové v metabolických procesech kvasinek

Kyselina pyrohroznová je významný intermediát v metabolismu sacharidů kvasinek, tvoří výchozí sloučeninu, od které se metabolismus může vyvíjet třemi směry [4]:

1. Účinkem enzymu pyruvátkarboxylázy se směřuje k tvorbě dalších ketokyselin Krebsova cyklu a k procesu dýchání.
2. Účinkem pyruvátdekarboxylázy k tvorbě aldehydu, případně ethanolu nebo acetoinu a k procesu kvašení.
3. Účinkem enzymu fosfoenolpyruvátkarboxylázy k procesu glukoneogeneze.

2.1.7.1. Glykolýza

Kvašení předchází celý proces degradace glukosu, až po vznik kyseliny pyrohroznové, nazývající se glykolýza. Je to základní metabolický děj probíhající téměř ve všech buňkách. Slouží k uvolnění energie z molekul sacharidů. Glykolýza probíhá za účasti desíti různých enzymů:

1. Hexokináza: enzymy kinázy přenášejí fosfátovou skupinu. Hexokináza je obsažena ve všech typech buněk a katalyzuje fosforylaci různých hexos. Na glukosu je přenesena fosfátová skupina z ATP za vzniku glukosa-6-fosfátu.
2. Glukózafosfátizomeráza: katalyzuje konverzi glukosa-6-fosfátu na fruktosa-6-fosfát (izomerace aldózy na ketózu).
3. Fosfofruktokináza: katalyzuje fosforylaci fruktosa-6-fosfátu na fruktosa-1,6-bifosfát. Je tady spotřebována další molekula ATP. Tento reakční krok určuje rychlost celé glykolýzy.
4. Aldoláza: štěpí fruktosa-1,6-bifosfát na dvě triosy – glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát. Reakce probíhá jako obrácená aldolizace.
5. Triosafosfátizomeráza: katalyzuje konverzi dihydroxyacetonfosfátu na glyceraldehyd-3-fosfát (pouze G-3-P pokračuje v další degradaci). Koncentrace obou izomerů je udržována v rovnováze. Triosafosfátizomeráza je označována jako dokonalý enzym, rychlost enzymové reakce je řízena difuzí, tj. tvorba produktu probíhá tak rychle, jak rychle dochází ke srážkám enzymu se substrátem.
6. Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza: katalyzuje reakci glyceraldehyd-3-fosfátu s NAD a Pi za vzniku 1,3-bisfosfoglycerátu, NADH a H. V reakci vzniká první makroergický produkt glykolýzy (tj. 1,3-bisfosfoglycerát).
7. Fosfoglycerátkináza: 1,3-bisfosfoglycerát se mění na 3-fosfoglycerát za předání fosfátové skupiny ADP a tvorby první molekuly ATP.
8. Fosfoglycerátmutáza: katalyzuje přeměnu 3-fosfoglycerátu na 2-fosfoglycerát. Mutázy katalyzují přenos funkční skupiny mezi dvěma polohami. Nejde o přesmyk fosfátu, ale enzym předává molekule svůj vlastní fosfát a pak si z molekuly druhý odebere. Proto je meziproductem reakce 2,3-bisfosfoglycerát, pomocí něhož glykolýza ovlivňuje transport kyslíku.
9. Enoláza: katalyzuje dehydrataci 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát.

10. Pyruvátkináza: tento enzym využívá volnou energii hydrolýzy fosfoenolpyruvátu pro syntézu ATP za současného vzniku pyruvátu. [6,7,9,10,22]

Glykolýzou se z 1 molu glukosy získají dva moly ATP. V první fázi glykolýzy se 2 ATP spotřebovávají a ve druhé fázi se 4 ATP vytváří. [9]

2.1.7.2. *Etanolová fermentace*

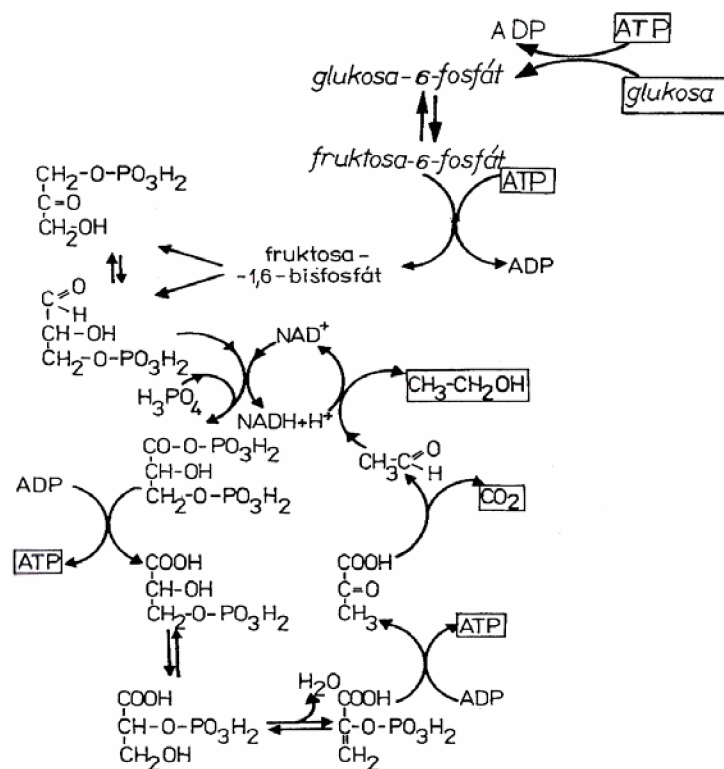
Etanolová fermentace probíhá v nepřítomnosti kyslíku (obr. 4). Úhrnná reakce je:



Alkoholové kvašení probíhá ve dvou reakcích. V první nastává dekarboxylace pyruvátu na acetaldehyd účinkem pyruvátdekarboxylasy, ve druhé pak redukce acetaldehydu na ethanol účinkem alkoholdehydrogenasy a NADH. Zisk 2 ATP (vzniklých substrátovou fosforylací) představuje asi 30 % celkové uvolněné energie. Pasteur prokázal, že kvasinky za anaerobních podmínek využívají mnohem více glukosy než za aerobních. Rychlost tvorby ATP za anaerobních podmínek může být až 100 krát rychlejší. [6, 7, 9, 24]

Pyruvátdekarboxyláza je enzym, který dekarboxyluje pyruvát na acetaldehyd bez současné oxidace, jak se děje při oxidační dekarboxylaci pyruvátu u aerobních organismů. Pyruvátdekarboxyláza není specifický enzym, mohou se s ním dekarboxylovat i jiné ketokyseliny, ne jenom kyseliny pyrohroznové. Koenzymem tohoto enzymu je thiamindifosfat (TDP), který stabilizuje přechodový stav v reakci odebráním negativního náboje. Thiamin jako vitamín B1 musí většina obratlovců přijímat potravou. Chybí-li vzniká onemocnění beriberi (bolesti, paralýza, atrofie končetin, hromadění tekutin ve tkáních a tělesných dutinách). Důležité je, že koenzym TDP je potřebný na produkci každého fermentačního produktu, který se tvoří z kyseliny pyrohroznové dekarboxylací: acetaldehyd, kyselina octová, kyselina mléčná, kyselina mravenčí, acetoin, dikarboxylové kyseliny s 4 C, kyselina citronová, kyselina 2-oxoglutarová, kyselina acetooctová, oxid uhličitý, voda, molekulový vodík atd.. Procesem dekarboxylace vzniká v kvasící kapalině i acetoin a diacetyl. Tvorbou těchto látek v pivovarských kvasinkách ve větším množství se může narušit sensorická vlastnost piva. Pivovarské kvasinky je možné použít i jako zdroj thiamindifosfátového koenzymu. Po přidání volného thiaminu se projeví jeho aktivační účinek na dekarboxylovaný systém. Tento účinek volného thiaminu není zapříčiněn zvyšováním množství enzymu, ale je to inhibiční účinek thiaminu na fosfatasy vyskytující se v kvasinkách, kterým chrání koenzym před defosforylací. [4,6,9,24]

Změnou kultivačních podmínek nebo použitím jiných mikrobiálních druhů lze zkrátit, odvětvit nebo prodloužit průběh etanolové fermentace a získat jiné produkty. Např. přidáním natriumbisulfitu do kultivačního media vzniká glycerol, který tak byl v minulosti fermentačně vyráběn.



Obrázek č. 4: Schéma etanolového kvašení [1]

Zajímavá je změna významu termínu fermentace za posledních 100 let. Původně byl vymyšlen pro označení dějů provázených mírným bubláním (a to nejprve pouze pro procesy vedoucí ke vzniku vína). V roce 1857 definoval Pasteur fermentaci jako „život bez kyslíku“. Dnes je název fermentace pro biotechnologie synonymem pro termín mikrobiální proces. Zahrnuje tedy množení (kultivaci) mikroorganismů, produkci metabolitů, provádění (bio)chemických transformací pomocí mikrobů. [6, 24]

Dnes se v praxi s fermentací setkáváme jednak v četných případech spontánního mikrobiálního rozkladu kyselých cukerných hmot, dále při záměrném zkvašování rmutů a štáv při biologických konzervačních procesech a konečně při velkovýrobě ethanolu pro potravinářské a lékařské účely a při velkoprodukcí alkoholických nápojů. Etanolové kvašení se uplatňuje i při použití pekařského droždí, neboť kynutí těsta je výsledkem produkce oxidu uhličitého při probíhajícím etanolovém kvašení. Mikrobiální výroba ethanolu a alkoholických nápojů patří stále mezi nejvýnosnější biotechnologie a představuje 75 % z celkového zisku biotechnologií. [1, 6]

2.1.7.3. Fermentace oligosacharidů

Aby se tyto sacharidy mohly zkvašovat, musí se nejdříve rozložit na monosacharidy katalytickým účinkem enzymů: maltázy nebo α -glukozydázy a invertázy nebo β -D-fruktozidázy.

Pravidla podle kterých probíhá kvašení sacharidů uplatňujících se při identifikačních testech kvasinek :

1. Když kmen zkvašuje glukózu, zkvašuje i fruktózu a manózu.
2. Když kmen nezkašuje glukózu, nezkašuje žádný jiný sacharid.
3. Když kmen zkvašuje maltózu, nezkašuje laktózu a opačně.

4. Když kmen zkvašuje některý z disacharidů, zkvašuje i glukózu.

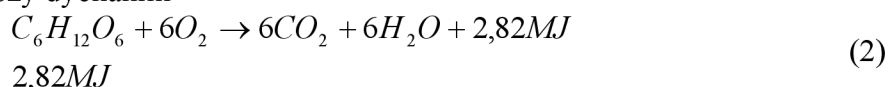
Na testování kvašení se většinou používají sacharidy: glukóza, galaktóza, maltóza, sacharóza, laktóza, rafinóza, a v poslední době i trehalóza, celobióza, a xylóza. Zjistilo se, že podle zkvašování maltózy a sacharózy se může vypracovat pomocná klasifikace v rámci rodů kvasinek. Klasifikační třídy tvoří čtyři kvasné typy [3,4,8] :

1. Maltóza + , sacharóza - .
2. Maltóza + , sacharóza + .
3. Maltóza - , sacharóza + .
4. Maltóza - , sacharóza - .

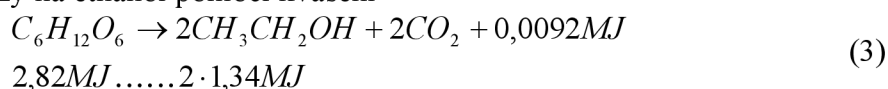
2.1.7.4. Vzťah mezi dýcháním a kvašením

Proces dýchání a kvašení se vzájemně překrývá. Z termodynamického hlediska není stejné, zda buňka spracovává sacharid oxidačně nebo anoxidačně. Čím vyšší spalné teplo mají látky, které vznikají při těchto procesech, tím méně energie se uvolní pro buňku.

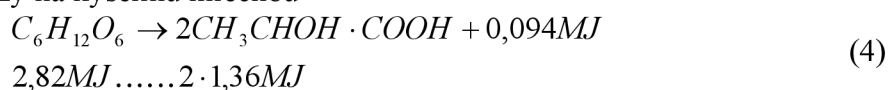
1. Oxidace glukózy dýcháním



2. Štěpení glukózy na ethanol pomocí kvašení



3. Štěpení glukózy na kyselinu mléčnou



Někdy se může i při oxidaci uvolnit méně energie, např. při vzniku kyseliny šťavelové. V anaerobních podmínkách se vytvoří 2 moly ATP na 1 mol zkvašené glukózy a výtěžkový koeficient $Y = 8,5$, v aerobních podmínkách se vytvoří 28 molů ATP na 1 mol zoxidované glukózy a $Y = 3,1$. [1, 4, 6]

V některých kvasinkových mikroorganismech probíhá dýchání i kvašení přibližně stejně, v jiných převládá jeden nebo druhý proces. Spodní pivovarské kvasinky dýchají ze všech kvasinkových mikroorganismů nejslaběji. Vrchní pivovarské kvasinky dýchají silněji i při stejném kvašení. Vinné kvasinky se podobají nejvíce pivovarnickým kvasinkám.

Kožkotvorné kvasinky mají velmi omezený metabolismus při dýchání i při kvašení. Někdy však dýchání úplně převládne, a tak vylučování oxidu uhličitého do prostředí je zanedbatelné. Většina těchto kvasinek zkvašuje jen glukózu a to často jen velmi málo. Zjistilo se, že hlavně Rhodotoruly, které nezkašují sacharidy silně dýchají. Tvoří však kyseliny a tak v prostředí s bikarbonátem musíme počítat i s přírůstkem oxidu uhličitého. [4]

Podle aktivity dýchání tvoří kvasinky tři skupiny, které ukazují plynulé změny redoxního potenciálu:

1. Převládá aerobní metabolismus, dýchání tvoří 100 %, např. krmné kvasinky.
2. Aerobní a anaerobní procesy se vyrovnávají, dýchání tvoří 40 až 50 % , např. patogenní kvasinky, pekařské a vrchní pivovarské kvasinky.
3. Převládá anaerobní metabolismus, dýchání tvoří přibližně jen 10 až 15 %, lihovarské kvasinky, vinné a spodní pivovarské kvasinky.

Změna anaerobních podmínek na aerobní v *Sacharomyces cerevisiae* znamená vzrůst množství vytvořené biomasy. Na tomto přírůstku se podílí mitochondriová oxidační fosforylace jako část energetické bilance kvasinek. Zahrnuje změny v procesech biosyntézy, využívání ethanolu produkovaného fermentativně a používá je na tvorbu prekurzorů buňkových složek. Když *S. cerevisiae* roste v anaerobních podmínkách bez toho, že by se jí dodávaly základní lipidy, ochuzují se její buňky o nenasycené mastné kyseliny a steroly. Hned jak se začne vzdušnit, rychle se obnovují mitochondriové funkce a budují se základní membránové lipidy a steroly.

Oba dva procesy, dýchání i kvašení, se dají měřit manometricky podle spotřeby kyslíku nebo podle vylučování oxidu uhličitého. Poměr dýchání a kvašení se vyjadřuje respiračním kvocientem Q_r , který může mít různou velikost závislé na druhu kultury. [4, 24]

2.1.8. Taxonomie kvasinek

Taxonomie je věda zabývající se uspořádáním organismů podle určitých pravidel do skupin tak, aby jejich uspořádání získalo určitý systém. Zkoumá soubory jejich vlastností, kterými se projevují, zkoumá jejich fenotypy a na zařazení podle fenotypů používá klasifikační zákony.

Fenotyp je každá měřitelná charakteristika a nebo rozlišující znak organismu, např. tvar a barva kolonie, produkce určitého enzymu, schopnost zkvašovat sacharidy, atd.

Klasifikační třídy se nazývají taxony. Taxony se seskupují podle podobnosti fenotypů a vytvářejí stupňovitou organizaci – hierarchickou organizaci. Stupňovitost hierarchických hladin:

- nejnižší stupeň - druh (lat. species),
- střední stupeň - rod (lat. genus), čeleď (lat. familia), řád (lat. ordo),
- vyšší stupeň - třída (lat. classis), oddělení (lat. divisio).

Druh je nejnižší základní taxonomická kategorie a může se dále dělit na poddruhy (lat. subspecies), variety (lat. varieta) nebo formy (lat. forma). Nejvyšší taxonomickou jednotkou je říše (lat. regnum), která se dále stupňovitě klasifikuje a nejvyšším stupněm v říši je kmen (lat. phylum), je třeba odlišit tento hierarchicky vysoký stupeň klasifikace od pojmu kmen jako klonální populaci vytvořenou z jedné buňky a tvořící infrastrukturu druhu. Do jednoho kmene patří organismy se společným předkem. Kdyby všechny organismy jedné říše měly společného předka, byla by to monofyletická říše a představovala by ideální případ pro taxonomistu. Mezi různými kmeny v jedné říši jsou však také podstatné rozdíly v charakteristice organismů a říše jsou proto polyfyletické. [3]

Na pojmenování druhů platí přesná pravidla. Název druh se skládá ze dvou slov, ze jména rodu a jednoduchého druhového přívlastku, epiteta. Rodové názvy jsou podstatná jména, mohou to být i přídavná jména zastupující podstatné jméno, v jednotném čísle a píšou se vždy velkým začátečním písmenem. Na rozdíl od druhových přívlastků, které se nikdy nepišou velkým začátečním písmenem, ale vždy malým. Druhové přívlastky jsou přídavná jména.

Typová kultura mikroorganismu se ukládá do některé veřejné světové sbírky kultur mikroorganismů. Tato kultura se nazývá holotyp. Každá jiná kultura toho stejného taxonu, izolovaná souběžně, je izotyp, později izolovaná je lektotyp. Často se stává, že fenotyp typové kultury se během dlouhotrvající kultivace ve sbírce změní a neodpovídá potom původnímu popisu, nebo že původní kultura zahyne. Je potom zapotřebí určit novou kulturu jako typovou

a ta se nazývá neotyp. Při revizi fenotypů velmi blízkých kultur se může zjistit, že patří k jednomu druhu, i když mají různá jména. V současnosti je však jen jedno jméno pravé, ostatní jsou synonyma. Když se má zvolit mezi větším množstvím synonymních jmen jméno pravé, tak se zvolí nejstarší jméno. [1, 3] Kvasinky se taxonomicky řadí:

- Super regnum (nadříše) - eukaryota.
- Regnum (říše) - fungi.
- Divisio (oddělení) - eumycota.
- Classe (třída) - ascomycetes , basidiomycetes, deuteromycetes.

Rody u nichž není známa tvorba pohlavních spor, jsou zařazovány mezi Deuteromycetes, dříve byly označovány také jako „nepravé kvasinky“. Když se během dlouhotrvající kultivace dokáže sexualita imperfektních forem, uvádějí se dále v perfektní formě. [1,3]

2.1.8.1. Význam taxonomie pro vědu a praxi

Kvasinky se uplatňují v klasickém kvasném průmyslu při výrobě piva a vína dále pekařského i krmného droždí. Získávají se z nich v menší míře biologicky aktivní látky, jako např. různé enzymy, vitamíny, sploidy jejich metabolismu atd. Snadno se pěstují v kulturách *in vitro*, z toho důvodu se používají jako modely ve vědě. *Saccharomyces cerevisiae* je nejčastěji používaným modelem v makromolekulové biologii, genetice, biofyzice, a také např. v genovém inženýrství a jinde. Kvasinky i kvasinkové mikroorganismy jsou i škůdci kvasných procesů a potravinářských výrob. Jsou důvodem onemocnění lidí i zvířat. Proto je velice důležité je odhalit, charakterizovat a zjistit i míru jejich škodlivosti. [1, 3]

Na biotechnologické účely se používají produkční kmeny, které se nejlépe osvědčily v určitých technologických podmínkách. Jejich výkonnost se zvyšuje šlechtěním. Prostřednictvím protoplastů možno křížit i vzdálenější druhy, dokonce i různé rody. Základem těchto prací je mít dobře definované kmeny, potřebný genofond. Genofond druhu považujeme za komplex jeho celé biologické aktivity jak uvnitř druhu (proměnlivost a využitelnost i části jeho genetické informace), tak i vně jako funkci druhu ve společenství ekosystému. Jednotlivé státy si udržují genofondy mikroorganismů ve formě sbírek, kolekcí, atd. pro účely vědy. Živý organismus se udržuje přeočkováním a čím častěji je třeba ho přeočkovat, tím snadněji může změnit svoje původní vlastnosti. Proto se kmeny uchovávají tak, aby se prodloužila jejich životaschopnost zastavením metabolismu, vysušením biomasy, nebo ve velmi nízkých teplotách, např. v kapalném dusíku při teplotě – 196 °C.

Sbírkou udržují typové kultury, aby měly porovnávací materiál na určování nových kmenů, produkční kultury, zajímavé mutanty, domácí izoláty i patentované kmeny. Kmeny sbírky se soustavně prověřují, aby byl jejich fenotyp důkladně zmapovaný a mohla se posoudit i stálost vlastností. Fenotypové vlastnosti se evidují (ukládají se fotografie kolonií, buněk, pseudomycélií a sbírají se další informace). Kmeny se zařazují do vyšších taxonomických kategorií. Každý kmen má svoje inventární číslo, označený původ a datum zařazení do sbírky. Inventární číslo má v předu značku sbírky (akronym), z které pochází a tato značka je neoddelitelnou součástí inventárního čísla. Každý kmen je definovaný, pokud uvedu původ kmene, charakterizovaný značkou sbírky, která bezprostředně předchází inventárnímu číslu. Např. *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CCY 21 – 4 – 13. [3]

2.1.8.2. *Zařazení rodů kvasinek do třídy Ascomycetes*

Ascomycetes (Endomycetes) vytvářejí endospory, mycelia bez přepážek, ureázu neprodukují. Zkvašují sacharidy, ale není to podmínkou. Pučí holoblasticky, buňková stěna je trojvrstvá, jsou nepigmentované. V buňkové stěně převládá manan a glukan. Obsah guaninu a cytosinu v DNA je 30 až 52 mol. %. Taxonomické zařazení [3] :

1. Kvasinky dělicí se přehrádkami a kvasinkové mikroorganismy s pravým myceliem
 - 1.1. Kvasinky s koherentním myceliem
 - 1.1.1. Předpokládání předchůdcové Endomycetes (např. rod *Ascoidea*)
 - 1.1.2. Ostatní rody čeledi Ascoidaceae (např. rod *Saccharomycopsis*)
 - 1.1.3. Anamorfní rody s koherentním myceliem
 - 1.2. Kvasinky s jehlicovými spory (čeleď *Spermophthoraceae*)
 - 1.2.1. Druhy a rody čeledě Spermophthoraceae (např. rod *Ashbya*)
 - 1.3. Kvasinkovité mikroorganismy s dizartikulovaným myceliem
 - 1.3.1. Čeleď Endomycetaceae
 - 1.3.2. Anamorfní druhy Endomycetaceae (rod *Geotrichum*)
 - 1.3.3. Anamorfní artrické druhy bazidiomycetového typu (rod *Trichosporon*)
 - 1.3.4. Jednibuňkové organizmy vytvářející spory (čeleď *Schizosaccharomycetaceae*)
2. Jednibuňkové pučící kvasinky
 - 2.1. Apikulární kvasinky čeledě Saccharomycodaceae (např. rod *Hanseniaspora*)
 - 2.2. Lipidotvorné kvasinky čeledi Lipomycetaceae (např. rod *Lypomices*)
 - 2.3. Kvasinky čeledi Saccharomycetaceae
 - 2.3.1. Kožkotvorné kvasinky (např. rod *Pichia*)
 - 2.3.2. Jednibuňkové, sedimentující a zkvašující kvasinky (např. rod *Kluyveromyces*)
 - 2.3.3. Malé rody askogeniích kvasinek (např. rod *Clavispora*)
3. Skupina anamorfních forem askogeniích kvasinek (např. rod *Candida*)

2.1.8.3. *Rod Hanseniaspora (imperfektní stadium Kloeckera)*

Buňky jsou citronovité, apikulární, oválné až protáhlé, pučí holoblasticky. Vytváří se většinou dobře vyvinuté pseudomycelium, někdy rudimentální pseudomycelium nebo se vůbec netvoří. Vegetativní buňky jsou diploidní. *Hanseniaspora* vytváří tři typy askospor:

1. Kloboukovité nebo helmicovité, po 2 až 4 v asku, které se z asků uvolňují.
2. Kulovité s hladkou nebo bradavicovitou stěnou a ekvatoriálním lemem.
3. Kulovité s bradavicovitou stěnou.

Hanseniaspora silně fermentuje glukózu. Zúčastňuje se kvašení moštu. *Hanseniaspora valbyensis* a *Hanseniaspora guilliermondii* se vyznačují podobností askospor (kloboučkovité spory) a řídkým nátěrem. *Hanseniaspora uvarum* v nátěru je řídká a hladká. Inhibuje růst bakterií, např. *Lactobacillus plantarum*. Dokonce produkuje i smrtící toxin. Uvedené druhy se dají izolovat z vody, půdy, plodů rostlin a z hmyzu. *Hanseniaspora vineae* tváří spory na agaru a nátěr je hladký a světle bílý. Vyskytuje se na hmyzu, v ovocných šťávách a v půdě. [1, 3, 5]

2.1.8.4. Rod *Pichia*

Rod *Pichia* je založený na druhu *Pichia membranaefaciens*, který izoloval Hansen z výtoku kořene stromu a nazval ho jako *Saccharomyces membranaefaciens* a později ho oddělil od rodu *Saccharomyces*, neboť tvoří kloboukovité spory a kožky na povrchu kapalin. Vytvořil se rod *Pichia* na počest vinařského mykologa Pichiho. Rod *Pichia* patří dnes mezi největší rody. [3]

Na základě podobnosti rodů *Pichia* a *Hansenula* došlo k jejich spojení a vznikl rod *Pichia* Hansen, který se rozděluje na dva podrody: *Pichia* a *Hansenula*.

Podrod *Pichia*: buňky jsou oválné až podlouhlé, množí se multilaterálním pučením. Tvoří pseudomycelium. Askospory jsou kulovité, někdy kloboukovité a rychle opouštějí askus. Na tekutých produktech často tvoří vráskovitou kožku bílé barvy a moučnatého vzhledu. Z cukrů vzniká kyselina octová. Organické kyseliny tvoří s alkoholy estery, které mohou způsobit v kvasicím produktu nepříjemnou chuť a vůni. Fermentují pentózy (xylóza a arabinóza). Vyskytují se ve fermentovaných nápojích, ovocných šťávách, i jako škůdci v kvašené kapustě. [1, 2, 5]

Druh *Pichia membranaefaciens* je typovým druhem rodu *Pichia* Hansen. Slabě fermentuje glukózu, asimiluje xylózu a organické kyseliny. Tvoří 1 až 4 askospory v jednom asku. Dusičnan neasimiluje. Nátěr je bílý nebo skořicověbílý, matný, hladký nebo jemně kučeravý, s nepravidelným okrajem. Vlastnosti a výskyt – viz. charakteristika podrodu *Pichia*.

Druh *Pichia fermentans* vytváří suchou kožku, stromečkovitě větvené pseudomycelium a nemá pravé hyfy. Nátěr je bílý, matný až kučeravý, okraj je cípovitý. Spory jsou kloboukovité, po 2 až 4 v asku, z kterého se lehko uvolňují. Sporadicky se vyskytuje i na přírodních stanovištích, např. na vinici a ve víně. Vlastnosti – viz. charakteristika podrodu *Pichia*. [2, 3]

Podrod *Hansenula*: tyto kvasinky tvoří buňky celkem rozličných tvarů: menší, kulaté, oválné nebo velice protáhlé buňky. Uvnitř buněk vznikají kulaté, polokulaté a kloboukovité spory, velice často prstencovitě uspořádané (spory saturnovité). Sporulují i v kožce. Asimilují dusičnan, tvoří kyseliny i estery. Dobře fermentují cukry. V přírodě jsou velmi rozšířené a vyskytují se převážně jako kontaminanty v různých potravinářských závodech. V pivovarech způsobují zákal piva. Oxidují ethanol, z alkoholů a kyselin vznikají estery zapříčiňující nežádoucí chuťové změny. Vyskytují se i psychrotrofní kmeny. [5]

Druh *Pichia subpelliculosa* na povrchu kapalin vytváří kožku, tvoří pseudomycelium, ale ne pravé mycelium. Je to heterotalický druh. Obsah guaninu a cytosinu v DNA je 39 až 46%. Využívá rozpustný škrob jako zdroj uhlíku. [1, 3]

2.1.8.5. Rod *Kluyveromyces*

Druhy rodu *Kluyveromyces* se původně zařazovaly do rodu *Saccharomyces*. Později se dokázalo, že rod *Saccharomyces* je velmi heterogenní a vznikl rod *Saccharomyces* in sensu stricto a *Saccharomyces* in sensu lato. Potom se některé druhy, odlišující se morfologicky a fyziologicky, oddělily do nově zřízeného rodu *Kluyveromyces*. Rod *Kluyveromyces* se od rodu *Saccharomyces* odlišuje svými vlastnostmi:

1. Druhy rodu *Kluyveromyces* vytvářejí spory rozličných tvarů, kulovité nebo bobovité.

2. Asky u druhů rodu *Kluyveromyces* po uzrání snadno pukají a uvolňují spory, ty pak spolu aglutinují do větších celků.
3. Druhy rodu *Kluyveromyces* oxidativně využívají širší paletu sacharidů než druhy rodu *Saccharomyces*.
4. Buňky druhů rodu *Kluyveromyces* jsou menší a jemnější a i pseudomycelium vzniká snadněji.
5. Druhy rodu *Kluyveromyces* neprokvášejí roztoky sacharidů tak hluboko jako druhy rodu *Saccharomyces*, vytvářejí jen 4 až 4,5 % ethanolu, je to proto, že vytvářejí kyselinu mléčnou v takovém množství jako je celkový obsah kyselin.
6. Druhy rodu *Kluyveromyces* produkují ethylacetát, druhy rodu *Saccharomyces* ne.
7. Biomasa rodu *Kluyveromyces* obsahuje často hemínové červené barvivo.
8. Oba dva rody se odlišují i haploidním genomem i počtem chromozomů v haploidních buňkách, *S. cerevisiae* má 17 známých chromozomů a *K. lactis* 9.

Druh *Kluyveromyces lactis* v kapalinách vytváří sediment a prstenec, ale tenká kožka je zpravidla na povrchu. Nátěr je hnědokrémový nebo krémověbílý, často kombinovaný s růžovým. Povrch je hladký i bradavicovitý, slizký i matný. Vegetativní buňky jsou kulovité nebo elipsoidní, i cylindrické a rozmnožují se pučením, jsou jednotlivé nebo v párech i v malých chumáčcích. Vytváří jen rudimentární pseudomycelium. A je to heterotalický druh. *K. lactis* fermentuje laktózu, používá se na fermentaci mléčné syrovátky za účelem výroby kvasničného krmiva. Vyskytuje se v mléčných produktech. [1, 3, 5]

2.1.8.6. Rod *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* zavedl roku 1838 Meyen a byla to jedna z prvních objevených kvasinek. Avšak tento rod definoval až roku 1870 Reess. Meyen použil název *Saccharomyces cerevisiae* pro pivovarnickou kvasinku a odlišoval ji od kvasinek, které zkvašovaly ovocné mošty. Reess, který morfologicky popsal tyto kvasinky, rozlišoval pivovarnické kvasinky *S. cerevisiae* a vinné kvasinky *S. ellipsoideus*. Avšak rozdíly mezi nimi zpřesnil až Hansen a zavedl i jejich fyziologickou charakteristiku.

Rod *Saccharomyces* aktuálně zahrnuje šest biologických druhů: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* a hybrid taxonu *S. pastorianus* (syn. *S. carlsbergensis*). *Saccharomyces sensu stricto* komplex obsahuje čtyři z nich: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* a *S. paradoxus*. [29,34,39]

Druhy rodu *Saccharomyces* se vegetativně rozmnožují multilaterálním pučením, holoblasticky. Buňky jsou kulovité, elipsoidní nebo cylindrické. Pseudomycelium se může vytvářet, ale ne pravé. Askospory jsou kulovité nebo mírně oválné s hladkou stěnou. V asku jsou zpravidla 1 až 4 askospory. Asky přetrvávají. Bouřlivě zkvašují sacharidy, amylozovou substanci nevytvářejí, nitráty neutilizují. [2, 3, 5]

Přírodní kmeny vinných kvasinek *S. cerevisiae* ve společnosti jiných kvasinek zkvašují mošty samovolně. Vinné kvasinky mají tvar a rozměr buněk kulovité, elipsoidní a protáhlý. Dokázalo se, že velikost a tvar buněk je v souladu s odolností k ethanolu v prostředí. Kulovité kmeny hlouběji prokvášejí a lépe odolávají ethanolu. Kvasinky izolované právě z přírody, z vinohradu, hned nemají vyrovnané tvary, mají však sklon hlouběji prokvášet a patří do skupiny s kulovitými buňkami. Předpokládá se, že kmeny s protáhlými buňkami se vyseletovaly během jejich pěstování v čisté kultuře. Tyto kmeny dobře odolávají

nepříznivým podmínkám konzervování a i úschově pod parafinem. Kvasinkové společenstvo v kvasícím moště obsahuje i jiné příbuzné druhy rodu *Saccharomyces*, např. *S. oviformis*.

Druh *Saccharomyces cerevisiae* je pивní, vinná, lihovarnická a pekařská kvasinka. Fermentuje glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu. Laktózu a dusičnan neasimiluje. Z fyziologických vlastností má největší praktický význam jejich schopnost anaerobně zkvašovat hexózy na ethanol a oxid uhličitý. Kvasinky *S. cerevisiae* se dobře pěstují na sladině, to se využívá při jejich identifikaci i při kontrole jejich čistoty. V kapalinách tvoří sediment a po čase může vytvořit i tenkou mázdu. Nátěr je těstovitý, krémový, světlehnědý, hladký, lesklý, ale může být i skládaný, kráterovitý, drsný. [1, 2, 3, 5]

2.1.8.7. Zařazení rodů kvasinek do třídy Basidiomycetes

Basidiomycetes vytvářejí bazidiospory (exospory), dikaryotická mycelia. Buňková stěna je lamelární, v povrchových vrstvách je slizovitá, často pigmentovaná. Obsah guaninu a cytosinu v DNA je 48 až 70 mol. %. Taxonomické zařazení [3] :

1. Červené kvasinkovité mikroorganismy
 - 1.1. Rody *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Cystofilobasidium*
 - 1.2. Karotenoidní kvasinky produkující balistokonidie (např. rod *Sporidiobolus*)
2. Krémové, pleťové, světležluté druhy (např. rod *Cryptococcus*)
3. Černé kvasinkovité organismy (např. rod *Aureobasidium*)
4. Kvasinky pučící na sterigmatech (např. rod *Sterigmatomyces*)
5. Sněhovité organismy
6. Slizovité bazidiomycetové organismy (rod *Apiotrichum*)
7. Organismy rodu *Candida* bazidiomycetového původu (slizovité + ostatní)

Červené kvasinkové organismy z oddělení Basidiomycetes se vyznačují produkcí karotenoidů. Karotenoidy jsou pigmenty nerozpustné ve vodě, rozpustné v tucích, a proto nikdy nedifundují do životního prostředí. Jsou lokalizované na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a vznikají poměrně složitým biomechanizmem. Kvasinkové organismy potřebují na tvorbu karotenoidů světlo, kyslík a proto tvorbě karotenoidů můžeme zabránit tmou a látkami brzdícími oxidační procesy. Při různých inhibičních zásazích v procesu tvorby karotenoidů se vytvářejí slaběji pigmentované, pleťové, žluté, pomerančové kmeny. Červeně pigmentované kmeny pokládáme za vývojově starší, žluté a pomerančové i pleťové za vývojově mladší. Červené kvasinky, jako jsou *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, jsou citlivé na lytické enzymy, izolované z bakterií. [3]

2.1.8.8. Rod *Rhodotorula*

Frezenius izoloval první rhodotorulu ze starého škrobového mazu a označil ji jako *Cryptococcus glutinis*. Harrison roku 1928 uvedl dva rody barevných kvasinek, *Rhodotorula* a *Chromotorula*. Do rodu *Rhodotorula* zařadil červené kvasinky a do rodu *Chromotorula* žluté, hnědé a černé kvasinky. Lodderová zavedla rod *Rhodotorula* Harrison pro červené, žluté a pomerančové kvasinky a rod *Chromotorula* zrušila. Toto hledisko se zachovalo až dodnes.

Rod *Rhodotorula* má buňky kulaté, oválné nebo protáhlé. Většinou netvoří pseudomycelium, nekvasí. Inozitol neasimiluje. V kapalných substrátech tvoří nejčastěji usazeniny. Nikdy netvoří kožku (mázdu). Je to pigmentovaná, červená nebo pomerančová,

slizovitá, měkká, štavnatá kultura, ale dikariotická kultura je drsná, suchá, hnědá až černá. Druhy rodu *Rhodotorula* jsou velmi rozšířené v přírodě (voda, vzduch, půda), v potravinách a nápojích jako kontaminanty. [1, 2, 3, 5] Združené druhy rodu *Rhodotorula*: *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*

V kapalném prostředí vytvářejí sediment a prstenec zpravidla světle růžové barvy. Nátěr na agaru je korálovočervený, pomerančový až lososový. Je hladký, lesklý, slizovitý, řídký i těstovitý, na povrchu může být někdy až kučeravý. Okraj kolonie je ucelený. Produkují ureázu a lipázu. Jsou lipidotvorné, hromadí v buňkách tuk. Jsou to ubikvitální kvasinky rozšířené po celém světě. V přírodě se nejčastěji vyskytuje *Rh. glutinis*.

Rhodotorula glutinis má schopnost přenášet přes cytoplazmatickou membránu metabolizovaná i nemetabolizovaná sacharidy, často proti velkým koncentračním gradientům. Stala se proto modelem na zkoumání transportu látek, hlavně pentóz, polyolů, atd.

Druh *Rhodotorula minuta* má kulovité nebo elipsoidní buňky. V kapalném prostředí vytváří tenký prstenec a sediment, nátěr je hladký a slizovitý.

2.1.8.9. Rod *Rhodosporidium*

Druh *Rhodosporidium toruloides* je kříženec, který vznikl zkřížením kvasinky izolované z lesa v blízkosti Osaky (*Rh. koishikawensis*) se žlutým mutantem *Rh. gracilis*, zasloužil se o to Banno. Anamorfní formou tohoto druhu je *Rhodotorula glutinis*.

Rhodosp. toruloides má haploidní kulovité nebo elipsoidní buňky, vyskytuje se i v homotalické linii, ke jsou vegetativní buňky delší a zaoblenější a tak může vytvářet i pravé mycelium s teliosporami. Haploidní kultura je pleťová nebo pomerančová, růžová. V místě kde se tvoří teliospory, tak hnědne a kučeravý. *Rhodosp. toruloides* je tedy heterotalický i homotalický druh.

Haploidní kultura je v nátěru červená, slizovitá, těstovitá, dikaryotická kultura je drsná, hnědá až černá, suchá. [1, 2, 3]

2.1.8.10. Rod *Sporidiobolus*

Zde patří růžové, pomerančové, žluté, červené karotenoidní kvasinky, které tvoří balistokonidie. Balistokonidie mají asymetrický tvar a vytvářejí se na jednoduchých nebo i rozvětvených sterigmatech, na kvasinkových buňkách i na myceliu. Jsou to homotalické i heterotalické organismy.

Druh *Sporidiobolus salmonicolor*. Fisher a Brebeck izolovali tento organismus z mořské vody u jižních Azor a nazvali ho předběžně *Blastoderma salmonicolor*.

Je to morfologicky i fyziologicky silně variabilní druh, a podobá se tak ostatním druhům rodu *Sporidiobolus*. Má elipsoidní i protáhlé buňky, jednotlivé, v párech nebo se vytvářejí prské i nepravé hyfy. Na kapalných médiích vytvářejí velmi kučeravou kožku. Nátěr na agaru je lososorůžový, broskvový, závisí to na složení půdy. Povrch nátěru je silně kučeravý a pomoučený.

Sporid. salmonicolor je heterotalický druh, vytvářející dikaryotické mycelium s přezkami a teliosporami. Teliospory jsou kulaté nebo oválné. Životní cyklus tohoto organismu může být i homotalický.

Druh *Sporidiobolus pararoseus* má kulovité, elipsoidní buňky různých tvarů. V kapalném prostředí vytváří bujný sediment a na povrchu kučeravou kožku. Nátěr na agaru

má barvu lososovou, korálovočervenou nebo broskvovou. Blastokonidie jsou asymetrické. Je to heterotalický, dvoupohlavní druh. [2, 3, 5]

2.1.9. Význam kvasinek při výrobě vína

Nejvíce kvasinek se vyskytuje na sladkých šťavnatých plodech rostlin, jako jsou malvice nebo bobule, ale je možné je najít i na suchých plodech, jako jsou nažky, tobolky nebo obilky. Sacharidy sladkých šťavnatých plodů se zkvašují na alkohol a tyto kvašené šťávy se používají jako vína nebo se destilují na silnější alkoholické nápoje – na různé druhy destilátů. Kvasinky se mohou izolovat přímo z plodů v přírodě, kde je jejich přírodní naleziště. Mohou se však izolovat i během kvašení rozdrceného ovoce a potom i z hotových výrobků, kde je jejich sekundární naleziště. [1, 2, 3, 12]

Kvašení vína je komplexní proces zahrnující bakterie a další mikroorganismy, nichž jsou nejdůležitější kvasinky. Kvasinky rodu *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* a *Pichia* se vyskytují v počátečních stádiích kvašení, ale jsou brzy nahrazeny více ethanol tolerujícími druhy *S. cerevisiae*, které doplňují fermentační proces. [27, 35, 40]

2.1.9.1. Přírodní naleziště

Sledovalo se 10 vinohradských oblastí v České republice a na Slovensku. Nejčastěji se vyskytuje druh *Saccharomyces cerevisiae*, 64 % na bílých a 50 % na modrých odrůdách hroznů. Druhým nejrozšířenějším druhem je *Kloeckera apiculata*, 14 až 15 % na bílých a 16 % na modrých odrůdách hrozna. Z nesporetvorných druhů se dále často vyskytuje anamorfní forma *Metschnikowia pulcherrima*, asi 7,2 % na bílých hroznech. Velice zajímavé je výskyt dokvášejících kvasinek *Saccharomyces oviformis*, které se vyskytují na hroznech jen málo, ale v moště a ve rmutech je jich asi 4 %. Tato kvasinka toleruje vysoké procento alkoholu, až do 16 %. Zřídka se vyskytuje hluboko prokvášející kvasinka *Sacch. uvarum*. [3]

Výskyt jednotlivých druhů kvasinek v moštích a rmutech se často objasňuje změnami v redoxním potenciálu. Životní rozmezí redoxního potenciálu pro kvasinky je 10 až 27,5 rH. Vlivem vzdušného kyslíku se redoxní potenciál zvyšuje. Na začátku spontánního kvašení se uplatňují druhy kvasinek, které snášejí vyšší redoxní potenciál, jako jsou druhy rodu *Kloeckera* a *Hanseniaspora*. Tyto kvasinky se hojně rozmnožují a určitý čas převládají nad ostatními kvasinkami. Zkvašují sacharidy, snižují redoxní potenciál, a tím se umožní rozvinout pravým vinným kvasinkám např. *Saccharomyces cerevisiae*. I kožkotvorné druhy kvasinek, jako *Pichia*, *Hansenula* nebo *Debaryomyces* snižují redoxní potenciál v prvních dnech kvašení moštu o 2 až 3 jednotky. Když se mošt zasyří, tak v něm zůstane asi 40 až 80 miliard kvasinkových buněk v jednom litru. Jsou to kvasinkové buňky, které snesou i nízké rH, např. *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces uvarum*, i některé vinné kvasinky, např. *Saccharomyces oviformis*, které potom zvyšují redoxní potenciál, a tak upravují podmínky pro *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* se mohou vyvíjet, rozmnožovat se a kvasit i při sníženém rH, dokonce se mohou i přizpůsobit. Po zasyření zůstanou jen odolné buňky, a tak se vyselektuje tzv. sulfitová kultura. Proti síření jsou odolné jen *Saccharomyces ludwigii*. U nás se však tato kvasinka vyskytuje jen ojediněle. Víno, které přišlo do styku se vzduchem, se okyslíčí a jeho redoxní potenciál se zvyšuje. Kožkotvorné kvasinky potřebují hodně kyslíku, proto se rozmnožují při povrchu moštu a svojí kožkou a metabolismem chrání víno před dalším okysličením. Hladina redoxního potenciálu se projeví i chuťově. Když se rH zvýší více než 21, kvasinky dodávají vínu nepříjemnou pachů, která

okolo rH 25 přechází na oxidační pachut'. Kožkotvorné kvasinky mohou chránit víno proti tomuto okysličování. [2, 3, 22]

Kvasinková společenstva na bílých a modrých odrůdách hroznů se navzájem odlišují kvantitativními poměry zástupců. Ve rmutech z modrých odrůd je podíl anamorfních forem o 25 % vyšší jako ve rmutech bílých odrůd. Zvyšuje se tu obsah anamorfů *Kloekera apiculata* a *Candida pulcherrima* na úkor *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces oviformis*. Poměr *Kloekera apiculata* a *Kloekera pulcherrima* je 1:1, v bílých odrůdách je 2:1 nebo 4:1. [2, 3, 22]

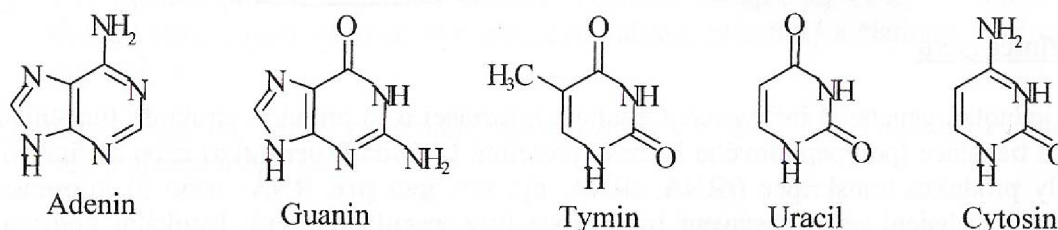
2.2. Nukleové kyseliny

Mezi nukleové kyseliny patří deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA). Molekuly DNA slouží jako depositář genetické informace. Z chemického hlediska je tato informace souborem návodů pro výrobu všech typů bílkovin daného organismu. Úsek DNA nesoucí instrukci pro výrobu jedné bílkoviny se nazývá strukturální gen a souboru všech genů říkáme genom. Geny se přepisují do molekul messenger RNA. Další úseky molekul DNA obsahují informace pro výrobu ostatních typů buněčných RNA a oblasti se specifickými sekvencemi plní regulační funkce. [6, 15]

2.2.1. Složení a struktura DNA a RNA

Obě nukleové kyseliny, jak DNA, tak RNA, jsou heteropolymerní látky složené z mnoha malých molekul, tzv. monomerů, které jsou vzájemně spojeny kovalentními vazbami. Monomery, které tvoří DNA nebo RNA, se označují jako nukleotidy. Každý nukleotid se skládá ze tří různých částí: cukru typu pentózy, dusíkatých heterocyklických bází a fosfátu. V případě DNA je cukrem deoxyribóza, u RNA je to ribóza. Tyto dva cukry se liší chemickou skupinou na uhlíku C2'. U deoxyribózy je to atom vodíku (H), u ribózy hydroxylová skupina (OH).

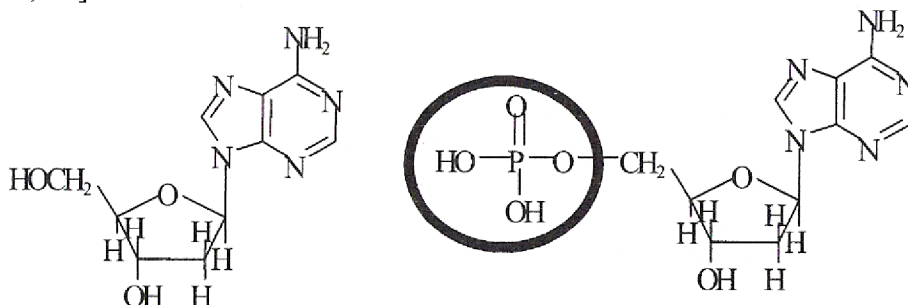
Součástí nukleových kyselin jsou dva typy heterocyklických dusíkatých bází, puriny a pyrimidiny. Z purinů jsou to adenin (A) a guanin (G), z pyrimidinů pak tymin (T), cytosin (C) a uracil (U) (obr.5). Adenin, guanin a cytosin se vyskytují v DNA a RNA, tymin pouze v DNA, uracil pouze v RNA. Baze jsou vázány kovalentní vazbou k sacharidu, a to v poloze uhlíku C1'. Spojením sacharidu s bází vzniká tzv. nukleosid. Pokud se k nukleosidu připojí fosfát nukleotid (obr.6). Fosfátová skupina je vázána k uhlíku C5'.



Obrázek č. 5: Struktura dusíkatých bází [15]

Jednotlivé nukleotidy se spojují do polynukleotidových řetězců (polynukleotidů) vytvářením kovalentních vazeb mezi fosfátovou skupinou jednoho nukleotidu a uhlíkem C3' druhého nukleotidu. Tyto kovalentní vazby se označují 3' - 5' fosfodiesterové vazby. Spojením dvou nukleotidů vzniká tzv. dinukleotid, atd. až polynukleotid. Uspořádání nukleotidů v řetězci DNA nebo RNA označujeme jako primární strukturu. Konce polynukleotidového řetězce

nejsou stejné, jeden obsahuje uhlík C5' s navázanou fosfátovou skupinou, druhý uhlík C3' s hydroxylovou skupinou. Tato asymetrie se označuje jako polarita polynukleotidového řetězce. [6, 7, 9, 15, 22]

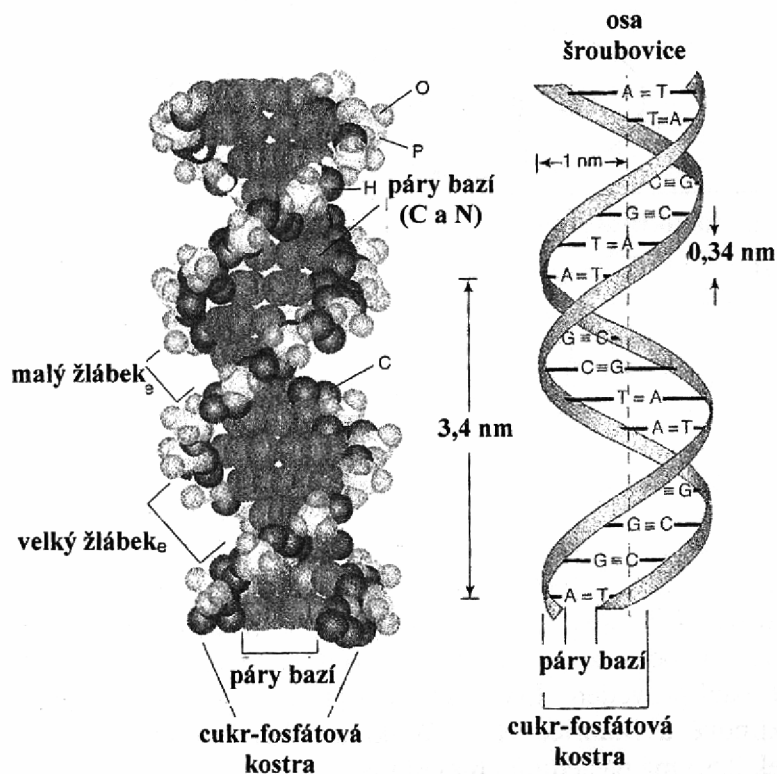


Obrázek č. 6: Struktura nukleosidu a nukleotidu [15]
vlevo - Nukleotid (deoxyadenosin), vpravo - Nukleotid (deaxiadenosin-monofosfát)

2.2.2. Struktura dvoušroubovicové DNA

Za objev molekulární struktury nukleových kyselin a její význam pro pochopení přenosu genetické informace v živých systémech obdrželi Crick, Watson a Wilkins v roce 1962 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. „Watson-Crickův model“ struktury DNA má následující hlavní rysy (obr. 7): [7, 15, 22]

1. Molekula DNA je složená ze dvou polynukleotidových řetězců, které jsou kolem sebe vzájemně obtočeny do tvaru pravotočivé dvoušroubovice, tzn. že závitý šroubovice se točí po směru hodinových ručiček.
2. Řetězce jsou antiparalelní, tzn. že jsou protisměrně orientované, jeden z nich má orientaci cukr-fosfátové vazby 5' - 3', a druhý 3' - 5'.
3. Cukr-fosfátová kostra je umístěna na vnější straně dvoušroubovice, baze jsou umístěny uvnitř a jsou orientovány kolmo směrem k centrální ose. Baze jsou plošné struktury poskládané jako mince ve sloupku na sobě a přitom jsou částečně pootočený, čímž kopírují otáčky šroubovice.
4. Baze na opačných řetězcích jsou spojeny vodíkovými vazbami. Přitom platí, že adenin se páruje dvěma vodíkovými vazbami s tymiánem a guanin třemi vodíkovými vazbami s cytosinem. Protože jsou vodíkové vazby relativně slabé, lze oba řetězce DNA snadno oddělit, například zahřátím. Páry A-T a G-C se označují jako komplementární páry bází, tzn. že nukleotidová sekvence v jednom řetězci předepisuje nukleotidovou sekvenci ve druhém.
5. Jednotlivé dvojice, tzv. páry bází (zkratka bp), jsou ve šroubovici DNA vzdáleny 0,34 nm. Na jednu otáčku připadá 10 bp. Jedna otáčka má tedy výšku 3,4 nm. Vnější průměr dvoušroubovice je 2 nm.
6. Díky charakteru párování bází nejsou oba dva cukr-fosfátové řetězce rozptýleny v prostoru rovnoměrně podél osy dvoušroubovice a výsledkem vinutí je existence velkého a malého žlábků. Ačkoli je velký žlábek širší a malý užší, oba jsou dost velké na to, aby se s jednotlivými bazemi mohly kontaktovat proteiny.



Obrázek č. 7: Watson-Crickův model struktury dvouřetězcové DNA. [15]

2.2.3. Různé strukturní formy DNA

DNA existuje v několika strukturních formách, které se označují jako A-, B-, a Z-forma. Základní Watson-Crickův model odpovídá formě B. Podobně jako forma B, i forma A je pravotočivá, forma Z je levotočivá. A-forma je kratší a širší, obsahuje 10,9 párů bází na jednu otočku a má úzký a velmi hluboký velký žlábek, zatímco malý žlábek je široký a mělký. Z-forma obsahuje 12 párů bází na otočku, je tenčí, má hluboký malý žlábek, velký žlábek leží na povrchu dvoušroubovice a nedá se od něj odlišit. V roztoku se DNA obvykle nachází ve formě B a je to její nejběžnější forma v buňce. Forma A je pozorovatelná, když je DNA dehydratovaná, takže se v živých buňkách nevyskytují dlouhé úseky v této konformaci. Funkce Z-DNA není úplně vyjasněna. [6, 7, 15, 22]

2.2.4. Replikace – biosyntéza DNA

Buňky musí být vybaveny aparátem, který jim umožňuje kopírovat geny, aby se v nich obsažené informace mohly přenášet z generace na generaci. Děje se to procesem biosyntézy DNA při dělení buněk. Toto kopírování genetické informace se nazývá replikace. [6, 7, 10]

2.2.4.1. Enzymy v biosyntéze DNA

Enzym, který se účastní replikace DNA, poprvé popsal A. Kornberg na modelu prokaryotické buňky *E. coli*. Za tuto práci obdržel Nobelovu cenu v oboru Fyziologie a medicíny v roce 1959. K replikaci DNA jsou zapotřebí [15]:

1. Čtyři základní nukleotidy, dATP, dGTP, dCTP, dTTP.
2. Fragment DNA jako matrice.
3. Enzym DNA polymeráza I (Kornbergův enzym).

4. Hořčnaté ionty pro zajištění optimální aktivity DNA polymerázy.

Enzym DNA polymeráza katalyzuje začlenění polynukleotidů do řetězce DNA. Tato reakce sestává ze tří základních kroků [6, 7, 15] :

1. Na konci, kde polynukleotidový řetězec narůstá (3'-OH konec), katalyzuje DNA polymeráza tvorbu fosfodiesterových vazeb mezi 3'-OH koncovou skupinou deoxyribózy na posledním nukleotidu a 5'-fosfátovou skupinou prekurzoru dNTP, kterým může být dATP, dGTP, dCTP nebo dTTP. Energie pro tvorbu fosfodiesterové vazby vzniká uvolněním dvou fosfátů z dNTP. Podstatné je, že prodlužování DNA řetězce probíhá na tzv. primeru, což je krátký, již existující oligonukleotid, a že nové nukleotidy jsou připojovány k volnému 3'-OH konci primeru.
2. Směr syntézy nového DNA řetězce je od konce 5' ke konci 3', což je dáno vlastnostmi DNA-polymerázy. DNA polymeráza neumí připojovat nukleotidy k 5' - konci řetězce.
3. To, který nukleotid bude připojen k nově vznikajícímu dceřinému řetězci, je řízeno sekvencí nukleotidů na řetězci mateřském. Nově připojený nukleotid se musí komplementárně vázat na nukleotid v mateřském vlákně podle pravidel o párování bází. Dceřiný řetězec je syntetizován rychlostí asi 600 nukleotidů za sekundu.

Kromě polymerázové aktivity má DNA polymeráza aktivitu exonukleázovou, tedy schopnost DNA řetězec odbourávat, a to buď od konce 3', tedy tzv. 3'→5' exonukleázovou aktivitu nebo od konce 5', tedy tzv. 5'→3' exonukleázovou aktivitu. Exonukleázová aktivita 3'→5' slouží jako opravný mechanismus. Ten se uplatňuje v situaci, kdy DNA polymeráza rozpozná, že v dceřině buňce je nesprávně začleněný nukleotid. Tato schopnost DNA polymerázy opravovat chyby se označuje jako korektorová a díky ní se četnost chyb při replikaci snižuje. Exonukleázová aktivita 5'→3' se uplatňuje zejména při replikaci (odbourávání tzv. RNA-primeru) a také při opravách poškozené DNA. [10, 15, 22]

Dnes víme, že v buňkách *E. coli* existují nejméně tři různé DNA- polymerázy, lišící se molekulovou hmotností a katalytickou účinností. Enzymem, katalyzujícím vznik nového polynukleotidového řetězce DNA, je až později objevená DNA-polymeraza III, má také exonukleázovou aktivitu. Funkce DNA-polymerazy II není dosud známa.

V roce 1968 R. Okazaki při studiu replikace DNA *E. coli* zjistil, že jedno z dceřiných vláken DNA vzniká po malých fragmentech, tvořených asi 1000 – 2000 nukleotidovými zbytky, byly nazvány Okazakiho fragmenty. Jedno z nově tvořených vláken DNA se tedy netvoří kontinuálně podél celé délky mateřského vlákna, ale kus za kusem.

Enzym, který katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi dvěma úseky řetězce DNA, resp. vazbu uzavírající polynukleotidový řetězec do kruhové formy, se nazývá DNA-ligáza. Vyžaduje volnou hydroxylovou skupinu na 3'-konci jednoho fragmentu polydeoxyribonukleotidového řetězce a fosforylovou skupinu na 5'.konci druhého fragmentu. DNA-ligáza dovede spojovat pouze polydeoxyribonukleotidové úseky, které jsou součástí dvouvláknové DNA, a nikoliv dvě jednovláknové DNA. [6, 7, 22]

2.2.4.2. Mechanismus replikace

Replikace začíná ve specifických místech chromozomu, zvaných počáteční body replikace (iniciační body). Vzhledem k rychlosti replikace a rozsahu kopírovaných DNA musí replikace

současně vycházet z mnoha iniciačních bodů. Úseky, které jsou replikovány z jednoho bodu replikace, se nazývají replikony. Chromosom eukaryotních buněk zahrnuje asi 1000 replikonů.

V místech iniciačních bodů se dihelix DNA rozpletením rozevře a nabývá tvaru vidlice. Do ní nasedne do obou mateřských vláken RNA-polymerázy a vytvoří na každém z nich krátký RNA-primer. Na něm pak dochází k vlastní replikaci, spočívající v napojování jednotlivých nukleotidů v předepsaném pořadí za katalýzy DNA-polymerázou III.

Dceřiné vlákno, které roste od iniciačního bodu směrem k vidlici, se syntetizuje kontinuálně, a bývá nazýváno vedoucí vlákno. Vlákno vyráběné v opačném směru, s 5'-konci orientovanými směrem k místu rozplétání, se však musí syntetizovat po částech. Jak se postupně stává dostupným rozplétající se řetězec mateřské DNA, slouží jako matrice. Bývá nazýváno zpožděvané vlákno.

Dalším krokem v procesu replikace je odstranění úseků RNA (primerů) pomocí hydrolytického účinku DNA-polymerázy I, která pak replikázovou aktivitou nahradí odstraněný primer polydeoxyribonukleotidovým úsekem.

Okazakiho fragmenty a úseky vytvořené činností DNA-polymerázy I jsou pak spojeny v souvislý řetězec pomocí DNA-ligázy. [6, 7, 9, 10, 22]

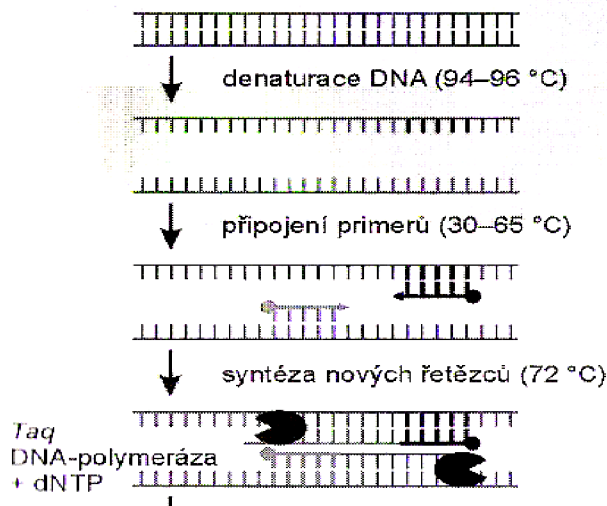
2.3. Amplifikace DNA in vitro pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je enzymová metoda, která slouží k rychlé syntéze velkého množství definovaného úseku DNA *in vitro*. Vzhledem k vysoké citlivosti detekce je možné PCR použít pro zjištění i velmi malého množství nukleové kyseliny ve vzorku (teoreticky by měla stačit jediná molekula DNA). Základem úspěšné reakce je použití neporušeného úseku DNA, který má být amplifikován. Dále je důležité navržení vhodných primerů tak, aby byla zajištěna specifita reakce. Je nutné zdůraznit, že pro PCR je důležité znát sekvence hraničních úseků fragmentu, který má být amplifikován. [16, 19, 20]

2.3.1. Princip PCR

Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy např. *Taq* DNA-polymeráza, při níž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně v cyklech. PCR je proces při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu (obr. 8):

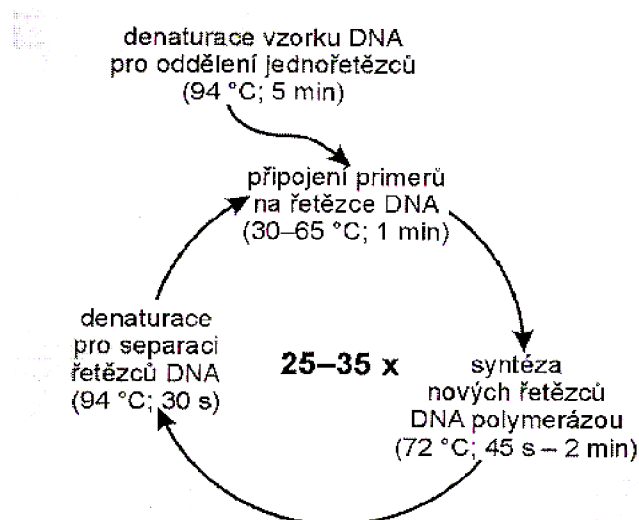
- denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C),
- připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30-65 °C),
- syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65-75 °C).



Obrázek č. 8: Princip polymerázové řetězové reakce (PCR) [17]

Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovatelných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně (2^n = počet cyklů) vytváří až miliardy kopií vybraného úseku cílové molekuly. [16, 17, 18, 19, 21]

Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů (obr. 9). Příliš vysoký počet cyklů zvyšuje množství vznikajících nespecifických produktů PCR. Pro PCR je důležitá úplná počáteční denaturace templátu a obvykle stačí zahřátí směsi na 94–97 °C po dobu 2–5 min. Pokud dojde jen k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují, což vede k nespecifické vazbě primerů a falešným výsledkům. *Taq* DNA-polymeráza má při 95 °C poločas stability 40 min, a tak se volí pro následnou denaturaci ampliconů během reakce doba 15 až 45 s. Podmínky pro hybridizaci primerů závisí na zastoupení bází, délce oligonukleotidů a hodnotě T_m produktu. Teplota pro hybridizaci primerů (T_a) se obvykle pohybuje v rozmezí 55 až 68 °C po dobu 30 až 60 s, doporučuje se však provést její optimalizace. Syntéza DNA probíhá zpravidla při 68 až 72 °C po dobu 45 s až 2 min. *Taq* DNA-polymeráza při této teplotě syntetizuje DNA rychlostí cca 60 bází/s.



Obrázek č. 9: Teplotní režim a doby trvání jednotlivých kroků při polymerázové řetězové reakci [17]

Přesné hodnoty teploty a doby trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat. Pro získání požadovaného produktu, specifčnosti a výtěžku je důležitá koncentrace jednotlivých složek reakční směsi. Kromě Taq DNA-polymerázy a primerů obsahuje reakční směs jako kofaktor hořčnaté ionty, které tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) rozpoznávaný DNA-polymerázou. Hořčnaté ionty interagují nejen s dNTP, ale i s primery, templátovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly. Je třeba ve většině případů stanovit pro každou aplikaci optimální koncentraci hořčnatých iontů empiricky. Příliš vysoká koncentrace některé ze složek reakce může vést k chybám a vzniku nespecifických produktů. [17, 18, 19, 20, 21, 29]

Výsledným produktem PCR jsou amplikony, což jsou úseky DNA definované délkou o velikosti desítky až tisíce bp. [16, 17]

2.3.2. Komponenty PCR směsi

Reakční směs pro PCR se skládá z následujících komponent [17, 20] :

1. DNA templář,
2. 10x PCR pufr obsahující hořčnaté ionty,
3. dNTPs mix (směs všech čtyř deoxyribonukleotidů),
4. 2 primery (každý cca 20 nukleotidů),
5. Taq DNA-polymeráza,
6. redestilovaná voda.

2.3.2.1. Primery

Přesnost a úspěšnost PCR při amplifikaci určitého genu nebo části sekvence genomové DNA je závislá na pečlivém návrhu obou primerů, při němž je třeba přihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu. Pro návrh vhodných primerů platí několik zásad. Je třeba zdůraznit, že nejsou univerzální, ale pouze orientační:

1. délka zpravidla 18 až 25 nukleotidů,
2. obsah G+C 40 % až 60 %,
3. rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry,
4. teplota T_m (teplota tání) primeru alespoň 50 °C,
5. podobná teplota T_m u obou primerů,
6. specifčnost primerů tzn., že na matricové DNA nesmí být nespecifická vazebná místa,
7. absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbě duplexů,
8. absence vnitřních sekundárních struktur,
9. zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C v sekvenci na 3'-koncích primerů pro zajištění přesné vazby na templát.

Pro návrh primerů v analyzovaných oblastech sekvence DNA existuje řada počítačových programů, které umožňují zohlednit výše zmíněná pravidla. [17, 19, 20, 21]

2.3.2.2. Termostabilní DNA-polymerázy

PCR využívá termostabilní DNA-polymerázu pro opakovanou syntézu obou vláken. Podmínka teplotní stability enzymu je dána tím, že jedním krokem opakovaných cyklů je

denaturace DNA (cca 95 °C). Když by byla DNA-polymeráza při tomto kroku inaktivována (což je případ všech běžných enzymů), bylo by nutno ji při každém cyklu po denuraci přidat. V principu by byl tento postup možný, metoda by se stala natolik nákladnou, že by byla nepoužitelná.

Použití termostabilní DNA-polymerázy (*Taq* DNA-polymerasa z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*) zajišťuje dostatečnou aktivitu enzymu po celou dobu amplifikace. *Taq* DNA-polymerasa má teplotní optimum při 75 °C a poločas inaktivace při 95 °C je přibližně 40 min. Je to enzym, který má pouze 5'→3' polymerázovou aktivitu a postrádá 3'→5' exonukleázovou aktivitu, tedy není schopen opravovat chyby vzniklé při replikaci.

Taq DNA-polymeráza má vysokou procesivitu, což je termín vyjadřující schopnost syntetizovat dlouhé úseky DNA (až 10 bp). Další důležitou vlastností *Taq* DNA-polymerázy je limitovaná aktivita terminální transferázy, tj. schopnost připojovat na 3'-konce syntetizovaných fragmentů jeden nukleotid (thimid). [16, 17, 19]

Dále jsou také používány *Pwo* a *Pfu* DNA-polymerázy (zdroj – *Pyrococcus woesei* a *Pyrococcus furiosus*). Tyto enzymy mají kromě polymerázové aktivity také 3'→5' exonukleázovou aktivitu, tzn., že umožňují opravu chybně inkorporovaných deoxynukleotidů. Produkty těchto enzymů jsou syntetizovány s desetinásobně vyšší přesností ve srovnání s *Taq* polymerázou. Nevýhodou je jejich nižší procesivita ve srovnání s *Taq* polymerázou.

Tth DNA polymeráza je enzym izolovaný z bakterie *Thermus thermophilus*, který má stejné teplotní optimum jako *Taq* DNA-polymerasa. Předností tohoto enzymu je jeho schopnost působit i jako reversní transkriptáza a tedy možnost přípravy cDNA. [19, 20, 21]

2.3.2.3. Hořčnaté ionty

Koncentrace hořčnatých iontů může ovlivňovat účinnost a specifitu připojování primerů, teplotu disociace vláken templátové DNA i DNA produktu PCR, vznik primerových dimerů a aktivitu a přesnost enzymu. *Taq* DNA-polymeráza potřebuje hořčnaté ionty pro vazbu na templátovou DNA, primery a dNTP. Optimální hladina se mění v závislosti na sekvenci, která bude amplifikována a na povaze primerů. Nejlepší výsledky s genomovou DNA byly získány v pufru obsahujícím 0,5-1,5mM volný hořčík. Neboť dNTP kvantitativně váží hořčnaté ionty, množství hořčnatých iontů pro *Taq* polymerázu je koncentrace chloridu hořčnatého snižena o koncentraci dNTP. EDTA nebo jiné chelatony přítomné v roztoku DNA vzorků mohou snížit koncentraci hořčíku. Obecně platí, že jeho nedostatek způsobuje snížení výtěžku reakce, nadbytek snížení její specifity. Koncentraci hořčnatých iontů je proto nutné testovat zvlášť pro každou reakci. [18, 19, 20]

2.3.2.4. Deoxyribonukleosid trifosfáty (dNTP)

Deoxyribonukleotidy jsou stavebními kameny pro syntézu nových řetězců DNA. Patrně neovlivňují specifitu, ale bylo zjištěno, že jejich nižší koncentrace může významně zvýšit přesnost *Taq* polymerázy. Koncentrace 200 μM pro každý nukleotid je dostatečná a obecně představuje dobrý kompromis mezi výtěžkem a přesností. Všechny čtyři dNTP (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) se dávají v ekvivalentním množství. [19, 21]

2.3.3. Aplikace PCR

Polymerázová řetězová reakce, podobně jako molekulové klonování, umožnila řadu experimentálních přístupů jež byly dříve neproveditelné a počet aplikací PCR neustále

vzrůstá. PCR nachází uplatnění při syntéze fragmentů DNA na základě chromosomální DNA nebo cDNA při: mapování genomů, charakterizaci genů, analýze alelických sekvenčních změn, izolaci určitého genu ze vzorku tkáně, přípravě velkého množství templátu pro sekvencování, přípravě cDNA na základě zpětného přepisu mRNA pomocí RP-PCR, značení DNA inkorporací značených nukleotidů – příprava DNA sond pro hybridizaci, prenatální diagnostice dědičných chorob, detekci infekčních mikroorganismů a virů v potravinách, vodě a půdě atd. [16, 17, 18, 20]

2.4. Modifikace PCR

Polymerázová řetězová reakce je v současnosti základem téměř všech molekulárně biologických metod. Je používána v široké škále variant, které jsou upraveny podle toho, zda je potřeba amplifikovat templáty s nízkým počtem kopií, detekovat sekvenční polymorfizmy, provádět molekulární identifikaci nebo typizaci organismů nebo modifikovat sekvence nukleových kyselin. Tyto varianty se navzájem liší použitím dalších enzymatických reakcí kromě amplifikace Taq DNA-polymerázou, použitím specifických sekvencí primerů, přísnosti podmínek pro amplifikaci a způsoby detekce produktů PCR. [17]

Konvenční identifikační metody kvasinek, založené na morfologických, fyziologických, biochemických a genetických charakteristikách jsou časově náročné. Je nezbytné provést 50 až 100 fenotypových testů k identifikaci kvasinek na úrovni druhů. [25, 36, 37]

Mezi molekulárně biologické metody založené na PCR, které slouží k identifikaci kvasinek a k jejich zařazení na druhové nebo kmenové úrovni, patří: RFLP, RAPD, AFLP, DNA-fingerprinting. Tyto metody se vyznačují rychlou a precizní identifikací kvasinek v porovnání s tradičními fenotypovými metodami. [33, 29]

2.4.1. Restrikční analýzy

Termínem restrikční analýzy rozumíme soubor technik, využívajících zvláštní vlastnosti restrikčních endonukleáz. Endonukleázy se váží na specifické rozpoznávací sekvence dsDNA, přičemž oba řetězce štěpí buď uvnitř, nebo poblíž této sekvence. Rozpoznávací sekvence mohou být buď unikátní (např. enzym *Eco* RI), nebo neurčitá (např. *Hind* II), kdy jeden nebo více nukleotidů v sekvenci je libovolných. Místo štěpení DNA se označuje jako restrikční místo. Počet restrikčních míst na zkoumané DNA je závislý na její velikosti, na její sekvenci a také na délce rozpoznávací sekvence. [7, 19]

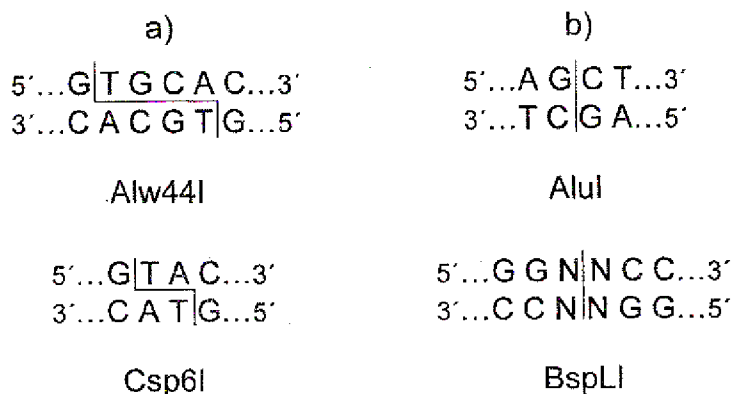
2.4.1.1. Restrikční endonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou obvykle bakteriální enzymy, které štěpí DNA pouze v místech se specifickou krátkou nukleotidovou sekvencí (obvykle 4-8 nukleotidových párů) a tak je vysoká pravděpodobnost, že se tato místa náhodně vyskytnou v každé delší molekule DNA. Proto mohou být tyto enzymy využity pro analýzu DNA z jakéhokoli zdroje. Využívají se ke štěpení genomové DNA na sadu specifických fragmentů. Restrikční endonukleázy zabraňují přenosu DNA mezi různými druhy bakterií, protože různé druhy bakterií syntetizují restrikční endonukleázy štěpící různé nukleotidové sekvence. [6,7,28]

Tyto enzymy jsou rozděleny do tří skupin: endonukleázy typu I, II, III. Endonukleázy typu I a III nemají přesnou polohu štěpení vzhledem k rozpoznávací sekvenci a proto se běžně nepoužívají. V molekulární genetice se používají endonukleázy typu II, které štěpí vždy ve stejném místě, které se nachází v rozpoznávací sekvenci a nebo v její těsné blízkosti.

Rozpoznávací sekvence jsou dlouhé čtyři, pět nebo šest nukleotidů a jsou oboustranně symetrické (palindrom). Je jich známo kolem 3000 a tvoří kolem 250 různých restričních míst. Např. enzym *Hae III* štěpí sekvenci tvořenou čtyřmi specifickými nukleotidovými páry, takže očekávaný výskyt rozpoznávacího místa v DNA daný náhodou je tedy jedno místo na každých 256 nukleotidových párů (jedno ve 4⁴ nukleotidových párech). Enzym *BamHI* jehož cílové místo je hexanukleotid by měl štěpit přibližně po každých 4⁶ nukleotidech (tj. 4096 nukleotidů).

Restriční enzymy štěpí DNA dvěma způsoby (obr.10): štěpí obě vlákna ve stejném místě (tvoří tzv. tupé konce) a nebo štěpí každé vlákno v jiné poloze (tvoří tzv. kohezní konce).



Obrázek č. 10: Příklad rozpoznávacích sekvencí a místa štěpení restričních endonukleáz:
a) vznik kohezních konců u sekvence palindromu (Alw44I, Csp6I),
b) vznik tupých konců u sekvence palindromu (AluI, BspLI). [18]

Kritickým parametrem při štěpení restričními endonukleasami je čistota použité DNA. Nečistoty, které mohou být přítomny po její izolaci, jako jsou proteiny, fenol, chloroform, EDTA, SDS, nebo vysoká koncentrace solí mohou inhibovat aktivitu enzymu. [17, 19, 28]

2.4.1.2. Metody používané k identifikaci kvasinek

AFLP (polymorfismus délek restričních fragmentů) je metoda založená na detekci DNA restričních fragmentů pomocí PCR amplifikace. Amplifikace restričních fragmentů je založena na ligaci ds adaptorových sekvencí na konec restričního místa, což slouží jako univerzální vazebné místo pro primery při PCR. Pomocí metody se detekuje polymorfismus v délce fragmentu, v restričním místě nebo v místě selektivních bází.

Výhodou metody je, že není nutné znát sekvenci zkoumané DNA. Pomocí AFLP markerů lze provádět zároveň srovnání celkové genomové DNA i klonů genomové DNA včetně tvorby transkripčních profilů při expresní analýze. [17, 18, 20]

RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfní DNA) je metoda pro tvorbu genomového fingerprintu u druhů, kde je málo známo o sekvenci, kterou budeme amplifikovat. K zahájení PCR se používá krátký málo specifický oligonukleotid, který se váže na příslušná místa amplifikované DNA. Jednotlivý jedinci (populace) se odlišují přítomností jednotlivých fragmentů, podle toho, kde na DNA primer našel homologní místa, což je právě důsledek polymorfismu DNA. Hlavní výhodou metody jsou nízké náklady a malá pracnost. [17, 18, 20]

DNA fingerprinting je metoda restriční digesce a vizualizace specifických úseků DNA, označovaných jako minisatelity. Minisatelity jsou krátké opakované sekvence 10 až 60 bp,

keré tvoří tzv. hypervariabilní oblasti genomu. Tyto oblasti jsou jedním z typů tzv. repetitivní DNA, skládající se z tandemově se opakujících jednotek.

Metoda využívá Southernův přenos a hybridizaci se značenou sondou. Díky vysoké sekvenční konzervativnosti minisatelitů se sondy většinou dokáží hybridizovat současně s více lokusy. Jedny z nejznámějších univerzálních sond mají prakticky stejnou sekvenci GGGCAGGAXG. V případě takového multilokusového fingerprintingu se u každého jedince objeví větší počet proužků, což nám umožní ho spolehlivě identifikovat. Výsledek takové analýzy se označuje jako molekulární otisk prstů (fingerprint), podle kterého celá metoda získala svoje označení. DNA fingerprinting je velice dobrá metoda na odlišení kvasinkových kmenů. [18, 20, 28]

RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) je metoda kde se pomocí RFLP identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického restrikčního místa. Genomová DNA je štěpena příslušnou restrikční endonukleázou, separována elektroforézou na agarózovém gelu.

Polymerázová řetězová reakce a polymorfismus délky restrikčních fragmentů jsou rychlé a spolehlivé metody pro molekulární charakterizaci kvasinek. Jsou velice užitečné pro charakterizaci kvasinek na úrovni rodů a druhů i kmenů a to záleží na výběru úseku vhodného pro amplifikaci oblasti DNA. [18, 30, 31, 32]

2.4.1.3. *PCR-RFLP (stanovení polymorfizmu délky restrikčních fragmentů u produktů PCR)*

Pomocí PCR na základě genomové DNA amplifikujeme specifické sekvence (např. úsek genu). Tento fragment DNA se štěpí panelem restrikčních endonukleáz. V případě bodové mutace v restrikčním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém gelu. Výhodou metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost detekce mutace (polymorfizmu) je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů. [17, 18]

PCR-RFLP analýza ribozomálních úseků sekvencí je přístupem použitelným pro kvasinkovou typizaci. Ribozomální DNA se skládá z malých 18S rDNA a velkých podjednotek 26S rDNA. Spacery tzv. konzervativní nekódující úseky vyplňují oblast mezi těmito podjednotkami. Oblast ITS obsahuje sekvenci kódující 5,8S rRNA a oblast IGS obsahuje sekvenci kódující 5S rRNA (obr. 11).

Oblast ITS může být amplifikována primery ITS1: 5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3' a ITS2: 5' – CTC TCT TTT CAA AGT GCT TTT CAT CT - 3'. IGS oblast může být amplifikována primery JV51ET: 5' – TGA ACG CCT CTA AGY CAG AAT C - 3', a JV52ET: 5' – TTA TAC TTA GAC ATG CAT GGC - 3'.

Délka ITS amplifikačních produktů se může lišit druh od druhu. Nicméně, rozlišení druhů je založeno na velikosti polymorfizmu amplikonů. Vyhovující stupeň variability ITS oblasti mezi 18S a 26S ribozomální DNA umožňuje identifikaci kvasinkových druhů. [23, 25, 26, 38]

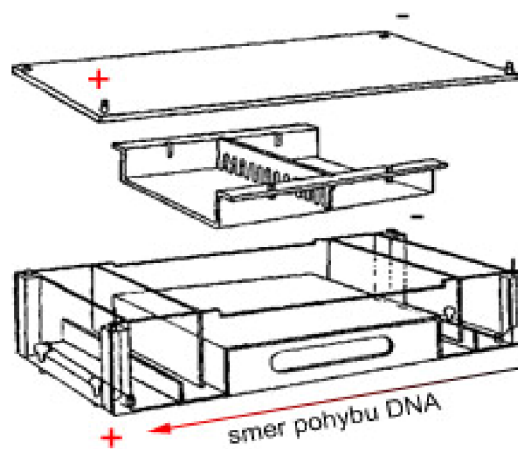


Obrázek č. 11: Schéma rDNA [23]

2.5. Elektroforéza v agarózovém gelu

Princip elektroforézy spočívá v dělení fragmentů DNA ve stejnosměrném elektrickém poli pomocí molekulového síta, který tvoří gel agarózy (obr. 12). DNA putuje ve stejnosměrném elektrickém poli od záporného ke kladnému pólu (od katody k anodě). Rychlost pohybu DNA v elektrickém poli je dána velikostí molekuly DNA a ne velikostí jejího náboje. Lineární fragmenty DNA se pohybují rychlostí, která je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Při elektroforéze je možné přímo sledovat polohu jednotlivých fragmentů a tím stanovit jejich velikost.

Elektroforetická pohyblivost DNA je také ovlivňována koncentrací agarózového gelu. Čím vyšší je jeho koncentrace, tím hustší je síť, kterou musí fragmenty DNA procházet. Elektroforéza je dále ovlivňována intenzitou elektrického pole, složením elektroforetického pufru a teplotou. [13, 14, 18, 20]



Obrázek č. 12: Schéma horizontální agarózové elektroforézy. [46]

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. Chemikálie, přístroje, suroviny

3.1.1. Chemikálie

Agarosa Eliphore, ethanol 96%, hydroxid sodný, octan sodný, kyselina chlorovodíková, uhličitan sodný. Tris (hydroxymethyl) aminomethan C₄H₁₁NO₃ (Serva Bitech, Německo), H₃BO₃, sodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové EDTA (Sigma Aldrich s.r.o., ČR), ethidium bromid.

Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon spol. s.r.o., ČR). Komponenty pro PCR: Taq DNA polymeraza, 10x Taq DNA pufr bez MgCl₂ + MgCl₂, primery (ITS1,ITS4), dNTP mix (Invitek, Německo). Nanášecí pufr (Fermentas, Litva), restriční endonukleasy- *Hae*III, *Hinf*I, *Mse*I, *Aha*I, TaqI, *Hha*I, *Hpa*II. Délkové standardy: 20 bp, 100 bp (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR), délkový standard 100 bp Plus (Fermentas, Litva).

3.1.2. Přístroje, zařízení

Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR), mikropipety Nichpetex (Nichrio, Japonsko), minicentrifuga National LABNET C- 1200 (BIOtech s.r.o., ČR), centrifuga eppendorf 5417 R (Eppendorf AG, Německo), termostat IP 100- U LTE SCIENTIFIC (Velká Británie), termocyklér PTC-100™ (MJ Research, Inc, USA), vortex-Genie 2 MO Bio (Biotech s.r.o., ČR), PCR box- AURA MINI (Bioair instruments, Itálie), elektroforetická vana (Owl separation systeme, model - B2 (Biotech s.r.o., ČR), zdroj napětí – SAVANT PS 250 (Biotech s.r.o., ČR), mikrovlnná trouba ETA 1195 (ČR), předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko), transluminátor (Ultra Lum. INC, USA), třepačka (Heidolph, Německo), Qubit™ Fluorometr, exikátor, sterilní box pro mikrobiologickou práci, parafilm (American Nacional Can™, USA), laboratorní sklo, mikrozkuhavky Eppendorf, plastové Petriho misky, bakteriologické klíčky, buničitá vata, parafin, sterilní voda, stojan, kahan, nůžky, lepící pásky.

3.1.3. Suroviny

Typové kvasinky (63 kmenů): sbírka kultur kvasinek (CCY, Chemický ústav SAV, Bratislava). Vzorky bílého vína a vzorky z listů, bobulí, a půdy červeného vína, které nebylo možné zařadit v rámci diplomových prací z roku 2008 [42, 43, 44]. Místo odběru: vinařská oblast Velké Pavlovice, soukromý vinař p. Šťavík. Přečištěné vzorky z roku 2008 – přečistil Chemický ústav SAV, Bratislava.

3.2. Příprava pracovních roztoků a chemikálií

3.2.1. Postup přípravy délkových standardů (20 bp, 100 bp, 100 bp Plus)

Při přípravě délkového standardu 100 bp bylo smícháno 3,2 µl roztoku 100 bp, 5 µl nanášecího pufru (loading buffer) a 21,8 µl sterilní vody.

Při přípravě délkového standardu 100 bp plus bylo smícháno 5 µl DNA standardu a 1 µl Orange Loading Dyesolution (délkový pufr) v eppendorfce (mikrozkuhavce). Také byl použit délkový standard 100 bp plus, který byl již namíchaný od výrobce.

Při přípravě délkového standardu 20 bp bylo smícháno 0,75 μ l roztoku 20 bp, 1 μ l nanášecího pufru (loading buffer) a 4,25 μ l sterilní vody. [42]

Při přípravě délkových standardů 100 bp a 20 bp byl použit loading buffer místo délového pufru, který byl dodáván výrobcem k odpovídajícímu standardu. Důvodem použití loading bufferu bylo lepší dělení standardů na 2 % agarózovém gelu při elektroforéze.

Nejvýhodnější je smíchat komponenty jednotlivých délkových standardů v desetinásobném množství, neboť v průběhu práce je tak dostatečná zásoba standardu.

3.2.2. Příprava Tris-borátového pufru (TBE)

3.2.2.1. Příprava zásobního roztoku 10×TBE

Na přípravu 10×TBE bylo naváženo 108 g Tris a 55 g kyseliny borité. Bylo přidáno 40 ml 0,5 M EDTA a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem.

Na přípravu 0,5 M roztoku EDTA o pH 8 bylo 9,36 g EDTA kvantitativně převedeno do 50 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou na daný objem. Změřené pH bylo upraveno přidávkem 0,5 % roztoku NaOH na hodnotu 8.

3.2.2.2. Příprava pracovního roztoku 1×TBE s ethidium bromidem

Ze zásobního roztoku bylo odpipetováno 100 ml do odměrné baňky o objemu 1 l. Odměrnou baňku byla doplněna destilovanou vodou na požadovaný objem. Bylo přidáno 100 μ l fluorescenčního barviva ethidium bromidu. Připravený roztok byl použit jako elektrolyt pro elektroforézu.

3.2.2.3. Příprava pracovního roztoku 1×TBE bez ethidium bromidu

Roztok byl připraven stejným způsobem jako pracovní roztok 1×TBE s ethidium bromidem, ale bez přidávku ethidium bromidu. Roztok byl použit na přípravu agarosového gelu. [43]

3.2.3. Příprava ethidium bromidu

Bylo naváženo 10 mg ethidium bromidu a rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán pomocí vortexu. Výsledná koncentrace roztoku byla 10 mg/ml.

3.2.4. Příprava 0,7 % agarosového gelu

Bylo naváženo 2,1 g agarosy do Erlenmayerovy baňky a zalito 300 ml pracovního roztoku 1 x TBE bez ethidium bromidu. Nejprve byla agarosa rozpuštěna v mikrovlné troubě při 100 % výkonu mikrovlné trouby. Pak byla 3 krát převařena v krátkých časových intervalech. Do odměrného válce bylo nalito 60 ml agarosy a přidáno 6 μ l ethidium bromidu. Připravený roztok byl nalit do předem vyvážené vaničky a pak do vaničky byly umístěny hřebínky, pro vytvoření jamek do nichž byly nanášeny vzorky. Gel se nechal ztuhnout při pokojové teplotě 30 minut a pak byl umístěn na 30 minut do lednice. Agarosový gel je takto připravený pro další použití. 0,7 % agarosový gel byl používán pro detekci PCR produktu. [42]

3.2.5. Příprava 2 % agarozového gelu

Do Erlenmayerovy baňky byly naváženy 3 g agarosy a bylo přidáno 300 ml pracovního roztoku 1 x TBE bez ethidium bromidu. Agarosa byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě při 100 % výkonu mikrovlnné trouby a pak byla 3 krát krátce povařená. Zmíněné množství je poloviční než bylo uvedeno v návodu a to z důvodu rychlého tuhnutí agarosy. Další postup je totožný s kapitolou 3.2.4.

3.2.5.1. Příprava octanového pufru

2,46 g CH₃COONa bylo naváženo do kádinky a rozpuštěno v destilované vodě. Pro úpravu pH na hodnotu 5,5 byla použita koncentrovaná HCl. Kvantitativně byl převeden roztok do odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Požadovaná koncentrace octanového pufru byla 3 mol/l. Dále byl octanový pufr rozpipetován do 2 ml mikrozkušavek a uložen do lednice při 4 °C. [43]

3.3. Očkování a kultivace kvasinek

Na pěstování kultur byly použity Petriho misky s tuhou sladinovou půdou, kde byly kvasinky zaočkovány pomocí očkovací kličky křížovým roztěrem. Očkovalo se ve sterilním boxu sterilní kličkou (pomocí plamene). Petriho misky byly řádně označeny: číslo kultury, datum očkování. Přeočkování kultury byly inkubovány při 27 °C po dobu sedmi dní.

Pro uchování kultur byly použity zaočkování zkumavky se šikmým agarem, které byly zalaty parafinovým olejem. [8]

3.4. Izolace kvasinek pomocí zřed'ovací metody

Pro získání čisté kultury z kultury směsné byla použita zřed'ovací metoda. Pomocí bakteriologické kličky byly z šikmého agaru odebrány 2 očka a přeneseny do první zkumavky z 10 ml sterilní vody. Obsah zkumavky byl promíchán pomocí vortexu. Po promíchání bylo z první zkumavky pomocí mikropipety odebráno 50 μl suspenze do druhé zkumavky, která obsahovala 10 ml sterilní vody, opět bylo vše promícháno na vortexu. Z druhé zkumavky byl odebrán 1 ml vzniklé suspenze do třetí zkumavky, která obsahovala 9 ml sterilní vody. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu. Na Petriho misku bylo odpipetováno 50 μl suspenze a roztírací tyčinkou byla suspenze rozetřena po celé ploše Petriho misky obsahující tuhou sladinovou půdu. Misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 26 °C po dobu 3 dnů. [8]

3.5. Izolace kvasinkové DNA

Pro získání kvasinkové DNA byla použita izolační sada Ultra Clean MO BIO Kit.

Do rozbíjecí mikrozkušavky s 300 μl rozbíjecího pufru byla pomocí bakteriologické kličky přenesena 2 očka velikosti rýžového zrna čisté kultury kvasinek. Bakteriologickou kličkou byl obsah mikrozkušavky rozsuspendován. Do mikrozkušavky bylo přidáno 50 μl roztoku MD1. Poté byly mikrozkušavky umístěny do horizontální polohy ve vortexu a pomocí lepicí pásky byly upevněny. Mikrozkušavky byly vortexovány při maximální rychlosti 10 min. Potom byly centrifugovány při 10 000 ot./min po dobu 1 minuty. Supernatant, který byl získán (předpokládané množství 300-350 μl) byl převeden do 2 ml mikrozkušavky. K supernatantu bylo přidáno 100 μl roztoku MD2, pak byl obsah mikrozkušavky zvortexován 5 sekund a inkubován při 4 °C po dobu 5 minut.

Mikrozkumavky byly centrifugovány při 10 000 ot./min po dobu 1 minuty. Odstředěný supernatant byl přenesen do 2 ml mikrozkumavky a bylo k němu přidáno 900 µl roztoku MD3 a vše bylo zvortexováno po dobu 5 sekund. 700 µl získaného roztoku bylo napipetováno do mikrozkumavky s kolonkou a centrifugováno při 10 000 ot./min po dobu 1 minuty. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a do mikrozkumavky byl přidán zbytek roztoku, který byl získán v kroku předtím. Zkumavky byly centrifugovány opět při 10 000 ot./min. po dobu 1 minuty a přefiltrovaný roztok byl odstraněn. Do kolonky bylo přidáno 300 µl roztoku MD4 a zkumavky byly centrifugovány při 10 000 ot./min po dobu 1 minuty. Přefiltrovaný roztok byl odstraněn a mikrozkumavky byly centrifugovány při 10 000 ot./min po dobu 1 minuty. Kolonka byla opatrně přenesena do nové mikrozkumavky a bylo přidáno 50 µl roztoku MD5 do středu bílé membrány uvnitř kolonky. Mikrozkumavky byly centrifugovány při 10 000 ot./min po dobu 1 minuty. Byla odstraněna kolonka a získaná DNA se skladovala při teplotě – 20 °C. [43]

3.6. Amplifikace kvasinkové DNA pomocí PCR

Komponenty PCR směsi byly pipetovány do mikrozkumavky ve stanoveném pořadí (viz níže). Objem reakční směsi pro jeden vzorek byl 150 µl. Pracovalo se ve sterilním boxu pomocí sterilních pomůcek, aby bylo zamezeno kontaminaci reakční směsi. Komponenty reakční směsi byly pipetovány v následujícím pořadí a objemu:

Sterilní voda	123 µl,
10 x pufr (10 mM)	15 µl,
dNTP mix (0,2 mM)	3 µl,
Primer (ITS 1) (0,5 µl)	1,5 µl,
Primer (ITS 4) (0,5 µl)	1,5 µl,
Templátová DNA	3 µl,
<i>Taq</i> polymeráza	3 µl.

Mikrozkumavky s reakční směsí byly důkladně zvortexovány a ihned umístěny do připraveného termocykléru s počáteční teplotou 94 °C. [42]

3.6.1. Program pro amplifikaci DNA

Počáteční denaturace probíhá při teplotě 94 °C po dobu 4 minut. Potom následuje 25 cyklů řetězové reakce :

1. Denaturace – 94 °C po dobu 1 minuty.
2. Navázání primerů – 48 °C po dobu 30 sekund.
3. Prodloužení primerů – 72 °C po dobu 1 minuty.

Konečná elongace tzn. dokončení syntézy DNA probíhá při teplotě 72 °C po dobu 10 minut. Po ukončení programu termocykléru byly vzorky uchovány při teplotě – 20 °C. [45]

3.6.2. Detekce PCR produktů pomocí elektroforézy

Po polymerázové řetězové reakci byla vždy provedena kontrola naamplifikované DNA pomocí horizontální elektroforézy na 0,7 % agarózovém gelu (viz. kapitola 3.2.4.).

Když gel ztuhl v elektroforetické vaně, tak byl opatrně vyjmut hřeben a komory byly zalaty pracovním pufrům TBE s ethidium bromidem. Byl použit takový objem pufru, aby jeho

hladina dosahovala několik milimetrů nad povrch gelu, a také aby byly zality všechny startovní jamky v gelu.

Na parafilmu byl smíchán 1 μl nanášecího pufru (loading buffer) a 5 μl PCR produktu. Připravené vzorky byly pipetovány do jamek gelu v množství 5 μl . Dále byl použit délkový standard 100 bp plus v množství 3 μl a samozřejmě negativní kontrola, které slouží k ověření nepřítomnosti kontaminace reagensů, použitých pracovních pomůcek i pracovního prostředí.

Poté bylo nasazeno víko na elektroforetickou vanu a připojen zdroj elektrického napětí. Bylo zvoleno napětí 65 V po dobu 150 minut, aby došlo k dobrému rozdělení délkového standardu. Po ukončení zvolené doby dělení, byl gel vyjmut z vany. Fragменты DNA byly vizualizovány pomocí transluminátoru a vyfoceny pomocí programu Scion Image pro následné vyhodnocení. [43]

3.7. Přečištění PCR produktů

Výsledky restrikční analýzy mohou být negativně ovlivňovány přítomností nečistot a inhibujících látek v roztoku s PCR produktem. Proto se před restrikční analýzou provádí přečištění (přesrážení) DNA.

Do nově připravené mikrozkuřavky bylo napipetováno 20 μl amplifikované DNA a 2 μl octanového pufru. Směs byla zvortexována a bylo přidáno 60 μl 96 % ethanolu (-20 °C). Opět byl obsah mikrozkuřavky zvortexován a centrifugován při 4 °C, 15 000 otáček po dobu 30 minut. Pak byl supernatant dekantován a ke sraženině bylo přidáno 60 μl 80 % ethanolu. Obsah mikrozkuřavky byl vortexován a centrifugován při 4 °C, 15 000 otáček po dobu 30 minut. Opět byla provedena dekantace a mikrozkuřavky byly uloženy do exikátoru, kde se během 25 minut vysušily zbytky ethanolu. [42]

3.8. Restrikční analýza PCR produktů

Při používání restrikčních enzymů je nutné se řídit pokyny výrobce. S enzymem je dodáván pufr v desetinasobné koncentraci (zajišťuje podmínky pro maximální aktivitu enzymu). Restrikční enzymy se uchovávají při teplotě -20 °C. Roztoky zůstávají kapalné při této teplotě, v důsledku přítomnosti solí a glycerolu.

Objem reakční směsi pro restrikční analýzu byl 15 μl a 23 μl . Pro větší množství vzorků byly opět připravovány reakční směsi a nakonec byla přidávána pouze DNA (přečištěný PCR produkt). K přečištěnému PCR produktu byly pipetovány komponenty pro restrikční analýzu o celkovém objemu 15 μl :

Sterilní voda	13 μl ,
Pufr (dodávaný výrobcem)	1,5 μl ,
Enzym (restrikční endonukleasy)	0,5 μl .

Pro restrikční analýzu o celkovém objemu 23 μl byly k přečištěnému PCR produktu pipetovány komponenty:

Sterilní voda	20 μl ,
Pufr (dodávaný výrobcem)	2 μl ,
Enzym (restrikční endonukleasy)	1 μl .

Mikrozkuřavky s reakční směsí byly důkladně zvortexovány při nízkých otáčkách delší dobu, aby došlo k důkladnému rozpuštění. Inkubace proběhla v termocykléru při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. [41]

3.8.1. Detekce restričních fragmentů pomocí elektroforézy

Restriční fragmenty byly detekovány pomocí horizontální elektroforézy na 2 % agarózovém gelu (viz. kapitola 3.2.5.).

Na parafilmu byl smíchán 1 μl loading bufferu (nanášecí pufr) a 5 μl vzorku. Na gel bylo nanášeno 5 μl této směsi. Dále byla pipetována pozitivní kontrola (PCR produkt) a délkové standardy (20 bp, 100 bp nebo 100 bp plus). Po skončení elektroforézy byly fragmenty DNA detekované UV zářením v transluminátoru. Gel byl vyfocen a jeho obrázek uložen do databáze na vyhodnocení. [42]

3.9. Analýza vlivu různých koncentrací Mg^{2+} na specifitu PCR

Při standardní PCR (1,5 mM MgCl_2) byla u některých vzorků pozorována amplifikace nežádoucích fragmentů DNA, proto bylo nutné ověřit, zda PCR probíhá za optimální koncentrace Mg^{2+} .

Řada komponent PCR (směs dNTP, testovaná DNA, primery, DNA polymeráza) má chelatační účinky, které se mohou za určitých okolností projevit ve snížené specifitě PCR. V testu byl použit 10 x Rec Taq pufr bez MgCl_2 + 25 mM MgCl_2 .

Příprava 46 μl reakční směsi probíhala, pro 1 mikrozkušavku bez MgCl_2 , smícháním následujících komponent:

Sterilní voda	35 μl
10x Rec Taq pufr bez MgCl_2	5 μl
10 mM dNTP mix	1 μl
Taq DNA polymeráza	1 μl
Primer (ITS 1) (0,5 μl)	1,5 μl
Primer (ITS 4) (0,5 μl)	1,5 μl
Studovaná DNA	1 μl

Pro 8 vzorků byl připraven mastermix. Jednotlivé komponenty byly napipetovány v množství vynásobeném počtem vzorků. Mastermix byl zvortexován, krátce stočen a rozpipetován po 46 μl do 7 mikrozkušavek. Zkušavky byly udržovány při +4 $^{\circ}\text{C}$ v ledové lázni.

Tabulka č. 1: Příprava různě koncentrovaného MgCl_2 ředěním 25 mM zásobního roztoku

Zk.č.	Koncentrace MgCl_2 v PCR směsi	25 mM MgCl_2 (μl)	H_2O (μl)
M1	2,0 mM	10	0
M2	1,8 mM	9	1
M3	1,5 mM	7,5	2,5
M4	1,2 mM	6	4
M5	1,0 mM	5	5
M6	0,8 mM	4	6
M7	0,0 mM	0	10

4 μl naředěného MgCl_2 (ze zkušavek M1-M7) byly přeneseny do odpovídajících zkušavek s 46 μl mastermixu. Potom byly zvortexovány, krátce stočeny a byla provedena PCR. Program pro amplifikaci DNA byl totožný jako v kapitole 3.6.1. s rozdílem jednoho parametru, teplota annealingu byla 48 $^{\circ}\text{C}$ a v druhém pokusu 57 $^{\circ}\text{C}$. Dále následovala detekce PCR produktu pomocí elektroforézy na 2 % agarózovém gelu.

3.10. Optimalizace koncentrace DNA pro PCR

Pro úpravu koncentrace DNA přidávané do reakční směsi pro PCR byly zvoleny čtyři vzorky vinných kvasinek (s29, 10, 16, 20) u nichž byla proměřena koncentrace vyizolované DNA dvakrát pomocí přístroje QubitTM Fluorometr. Získaná koncentrace vyizolované DNA byla následně zředěna na 5 ng/μl a do reakční směsi na PCR se přidával 1 μl DNA.

Tabulka č. 2: Koncentrace vyizolované DNA

Vzorek	Koncentrace vyizolované DNA (ng/μl)		Zředěná koncentrace DNA (ng/μl)
S29	39,20	35,35	5
10	23,10	16,00	5
16	30,20	25,50	5
20	12,00	7,16	5

Po provedené amplifikaci DNA následovala detekce PCR produktu pomocí elektroforézy na 0,7 % agarózovém gelu.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat metodu PCR – RFLP a taxonomicky zařadit kvasinky. Optimalizace metody PCR – RFLP spočívala v úpravě reakčních podmínek PCR tak, aby výsledné gely bylo možné objektivně vyhodnotit. Byla proto provedena analýza vlivu různých koncentrací Mg^{2+} na specifičnost PCR a úprava koncentrace DNA přidávané do reakční směsi pro PCR na 5 ng/ml.

Pomocí metody PCR – RFLP byla provedena identifikace vzorků bílého a červeného vína, které nebylo možné zařadit v rámci diplomových prací z roku 2008 [42, 43, 44]. Kontrolou bylo zjištěno, že některé vzorky obsahovaly více než jednu kvasinku, to znamená, že nebyly dostatečně přečištěny. Po provedeném přečištění (Chemický ústav SAV v Bratislavě) byly jednotlivé izolované kvasinky taktéž identifikovány. Analyzované kvasinky, které jsou označené čísly s apostrofem (př.17'') jsou nově přečištěné. Vybrané typové kvasinkové kmeny, které byly použity pro identifikaci našich kvasinek pocházejí ze sbírky kultur kvasinek z Chemického ústavu SAV v Bratislavě a ukázky jejich restriční analýzy jsou vždy přiloženy ke každé použité restriktáze.

4.1. Koncentrace vyizolované DNA

Koncentrace vyizolované DNA byla proměřena pomocí QubitTM Fluorometru. Izolace DNA probíhala pomocí komerční sady (viz kapitola 3.1.1.) a koncentrace vyizolované DNA se pohybovala v rozmezí 3-30 ng/ μ l (viz tab. č.3)

Tabulka č. 3: Koncentrace DNA u vybraných vzorků

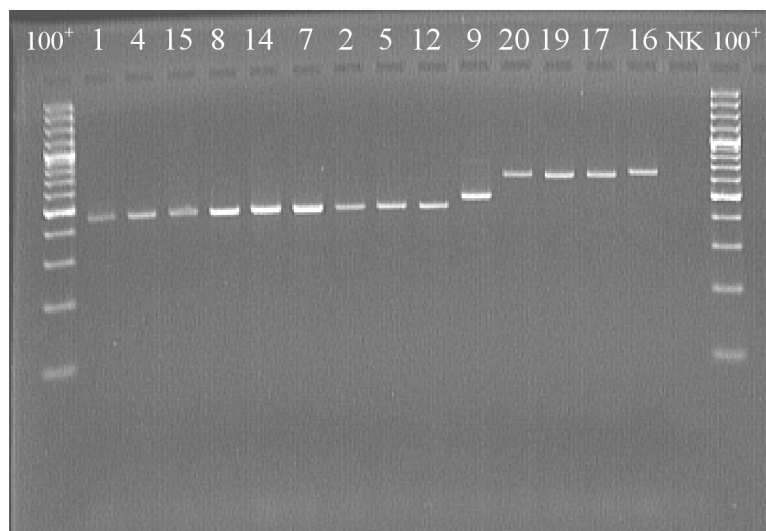
Označení vzorků (DP2009)	Označení vzorků dle (data odběru)	Místo a doba odběru	Označení vzorků (DP 2008)	Koncentrace vyizolované DNA (ng/ μ l)
1	BV (3.13.10)	7. den	102	16,00
2	BV (1.15.10)	9. den	96	28,50
4	BV (2.7.10)	1. den	83	17,70
5	BV (3.13.10)	7. den	62	21,60
7	ČVB (1.26.9.)	Bobule	7B	18,60
8	ČVB (1.26.9.)	Bobule	11B	9,43
9	ČVB (1.26.9.)	Bobule	6B	12,90
12	BV (2.9.10)	3. den	70	23,70
14	BV (2.7.10)	1. den	106	18,50
15	BV (2.9.10)	3. den	9	17,30
16	ČVP (1.23.10)	Půda	2P	30,20
17	ČVL (1.26.9.)	Listy	10L	8,67
19	BV (1.11.10)	5. den	104	8,06
20	BVL (3.11.10)	Listy	105	12,00

4.2. Amplifikace kvasinkové DNA pomocí metody PCR

Pro amplifikaci požadovaných úseků DNA pomocí polymerázové řetězové reakce byly použity primery ITS1 a ITS4, které mají sekvence:



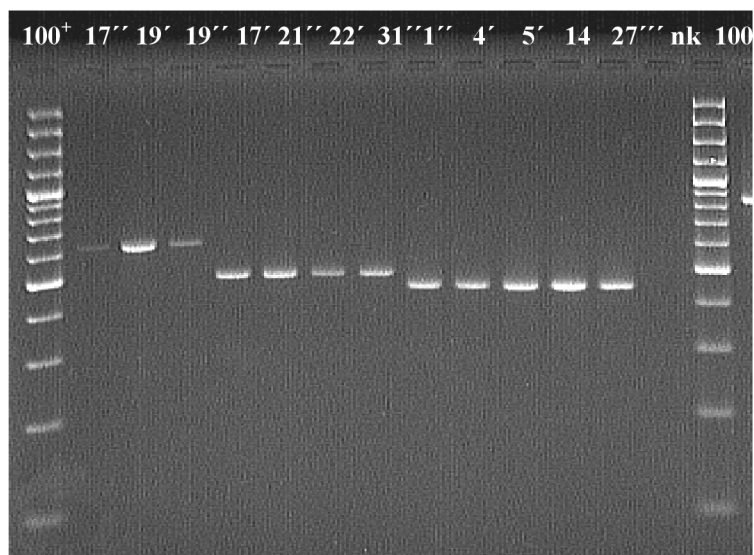
Kontrola amplifikovaného úseku DNA byla provedena elektroforeticky v 0,7 % agarózovém gelu. Z elektroforeogramu (obr. č. 13) je patrné, že u vzorků vinných kvasinek 1, 2, 4, 5, 7, 8, 12, 14, 15 došlo k amplifikaci DNA o délce 450 bp a u vzorků 16, 17, 19, 20, byla amplifikovaná DNA délky 650 bp. Amplifikovaná DNA vinné kvasinky 9 měla délku 500 bp. Délky jednotlivých fragmentů jsou uvedeny v tab. č.4.



Obrázek č. 13: Elektroforeogram amplifikované DNA vinných kvasinek (100⁺ - délkový standard, 1-16 - DNA vinných kvasinek po PCR, NK- negativní kontrola)

Tabulka č. 4: Délky amplifikovaných fragmentů po PCR u vzorků vinných kvasinek

Číslo vzorku	Délka fragmentů po PCR (bp)
1	450
2	450
4	450
5	450
7	450
8	450
9	500
12	450
14	450
15	450
16	650
17	650
19	650
20	650



Obrázek č. 14: Elektroforeogram amplifikované DNA vinných kvasinek (100⁺ - délkový standard, 17''-27''' - DNA vinných kvasinek po PCR, NK-negativní kontrola)

Z elektroforeogramu (obr. č. 14) je patrné, že amplifikovaná DNA vzorků vinných kvasinek 17'', 19', 19'' má délku 650 bp. U vzorků 17', 21'', 22', 31'' došlo k amplifikaci kvasinkové DNA na 500 bp a u vzorků 1'', 4', 5', 14, 27''' byla amplifikovaná DNA délky 450 bp. Délky jednotlivých fragmentů jsou uvedeny v tab. č. 5.

Tabulka č. 5: Délky amplifikovaných fragmentů po PCR u vzorků vinných kvasinek

Číslo vzorku	Délka fragmentů po PCR (bp)
17''	650
19'	650
19''	650
17'	500
21''	500
22'	500
31''	500
1''	450
4'	450
5'	450
14	450
27'''	450

Po amplifikaci kvasinkové DNA pomocí metody PCR byly vzorky, přečištěné i nepřečištěné, rozděleny na tři skupiny podle délky fragmentu.

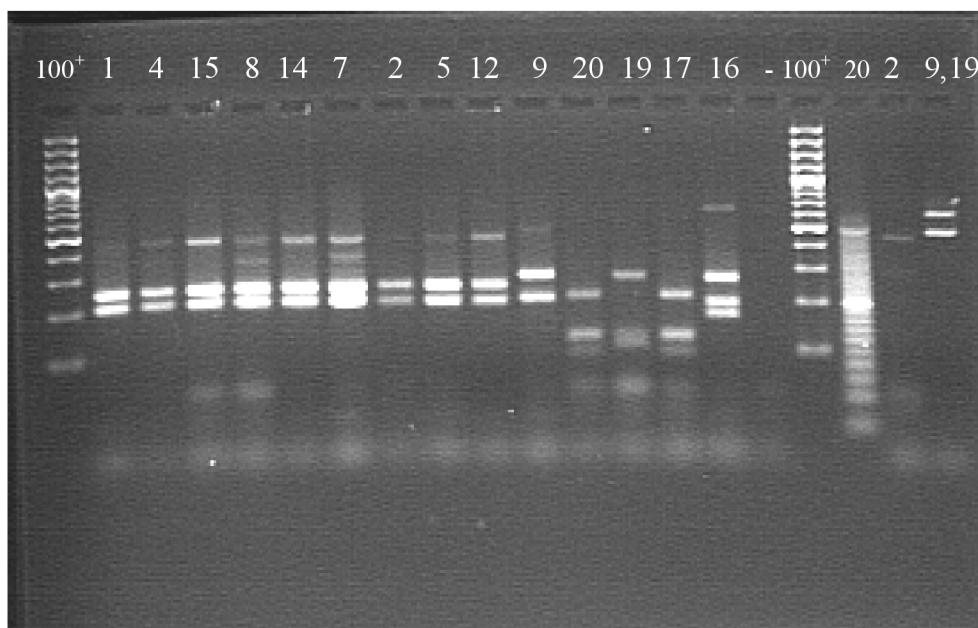
1. Skupina vzorků (1, 2, 4, 5, 7, 8, 12, 14, 15, 1'', 4', 5', 14, 27''') – 450 bp.
2. Skupina vzorků (16, 17, 19, 20, 17'', 19', 19'') – 650 bp.
3. Skupina vzorků (9, 17', 21'', 22', 31'') – 500 bp.

4.3. Vyhodnocení výsledků PCR-RFLP

Amplifikovaná DNA vzorků vinných kvasinek a typových kvasinek pomocí primerů ITS1 a ITS4 byla podrobena restriční analýze pomocí restričních endonukleáz *HinfI*, *HaeIII*, *TaqI*,

HhaI, *HpaII*, *MseI*, *AluI*. Na základě porovnání délek restričních fragmentů typových kvasinek ze sbírky kmenů kvasinek CCY z Chemického ústavu SAV v Bratislavě s délkami restričních fragmentů našich vzorků vinných kvasinek, byla provedena identifikace kvasinkových kmenů. Fragменты DNA byly detekovány pomocí elektroforézy v 2 % agarózovém gelu. V následujících kapitolách jsou seřazeny obrázky gelů, obsahujících fragmenty DNA po provedené restriční analýze jednotlivými restričními enzymy, a to jednak typových kvasinek, které slouží k porovnání a taxonomickému zařazení vzorků izolovaných vinných kvasinek, tak i kvasinek přečištěných. Délky restričních fragmentů jsou pro přehlednost seřazeny do tabulek.

4.3.1. Restriční analýza pomocí endonukleázy *HinfI*



Obrázek č. 15: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *HinfI* (délkový standard - 100⁺ bp, 1 – 16 - DNA vinných kvasinek po restriční analýze, 20 - délkový standard, 9,19- pozitivní kontrola)

Z elektroforeogramu (obr. č. 15) je patrné, že enzymem *HinfI* byly štěpeny všechny vzorky vinných kvasinek. Lze je rozdělit na dvě skupiny podle počtu délek restričních fragmentů. Vzorky 1, 4, 15, 8, 14, 7, 2, 5, 12, 9 byly štěpeny na dva fragmenty a u vzorků 17, 20, 19 a 16 došlo ke štěpení na tři fragmenty. V tabulce č. 6 jsou uvedeny délky fragmentů DNA po restriční analýze. Porovnáním vzorků vinných kvasinek s obrazem restriční analýzy typových kvasinek se ukázala podobnost pouze v rodu. Vzorky 1, 4, 15, 8, 14, 7, 2, 5, 12 byly zařazeny do rodu *Pichia* a vzorky 17, 20, 19 a 16 byly identifikovány jako rod *Rhodotorula*. Vzorek 9 je zařazen do rodu *Candida*.

Tabulka č. 6: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *HinfI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
1	250+200
4	250+200
15	250+200
8	250+200
14	250+200
7	250+200
2	250+200
5	250+200
12	250+200
9	280+200
17	220+140+100
20	220+140+100
19	280+140+120
16	280+200+180

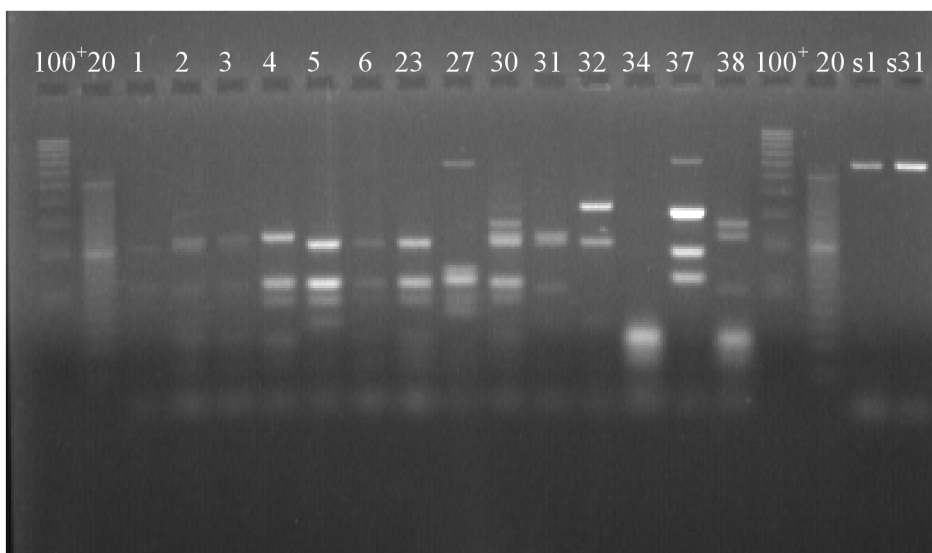


Obrázek č. 16: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *HinfI* (délkový standard - 100⁺ bp, 17'' - 27''' - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 17', 17', 1'' – pozitivní kontrola)

Enzymem *HinfI* byly štěpeny všechny vzorky přečištěných vinných kvasinek (viz. obr. 16). Ze srovnání elektroforeogramů (obr. č. 15 a 16) nepřečištěných a přečištěných vzorků vinných kvasinek, vyplývá, že shodně naštěpenou DNA měly kvasinky 1'' = 1, 4' = 4, 5' = 5, 14 = 14, 17'' = 17, 19' a 19'' = 19, 9 = 17', 21'', 22', 31''. Délky fragmentů DNA po restrikční analýze jsou uvedeny v tabulce č. 7.

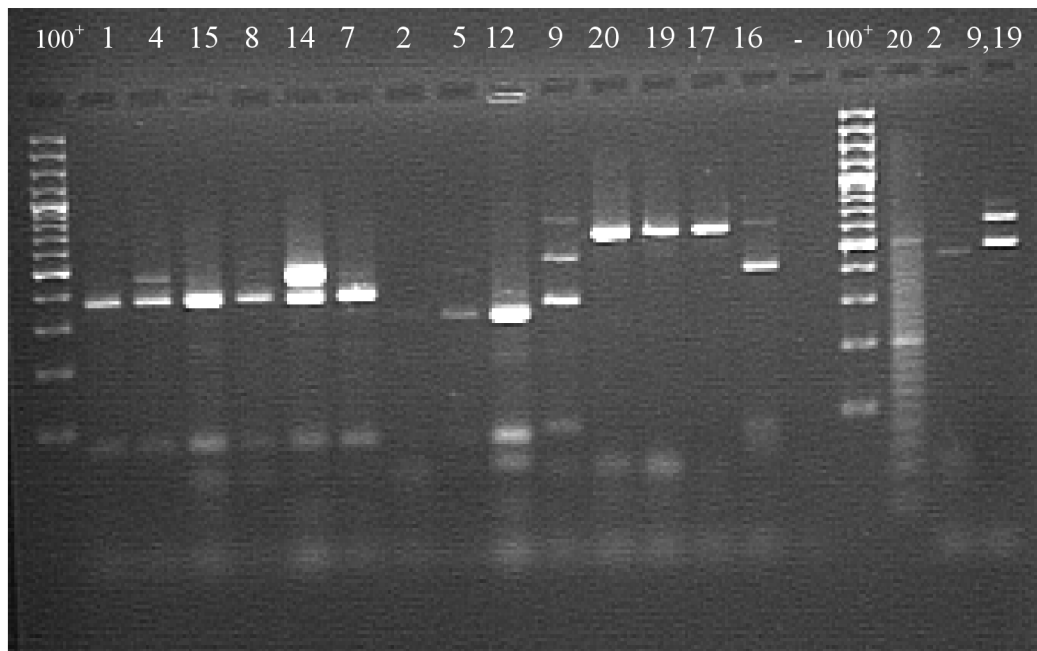
Tabulka č. 7: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *HinfI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
17"	220+140+100
19'	280+140+120
19"	280+140+120
17'	300+220
21"	300+220
22'	300+220
31"	300+220
1"	250+220
4'	250+220
5'	250+220
14	250+220
27'''	250+220



Obrázek č. 17: Ukázka elektroforeogramu po štěpení typových kvasinek endonukleázou *HinfI* (délkový standard - 100⁺ bp a 20 bp, 1 – 38 - DNA typových kvasinek po restrikční analýze, s1, s31 – pozitivní kontrola)

4.3.2. Restrikční analýza pomocí endonukleázy *HaeIII*

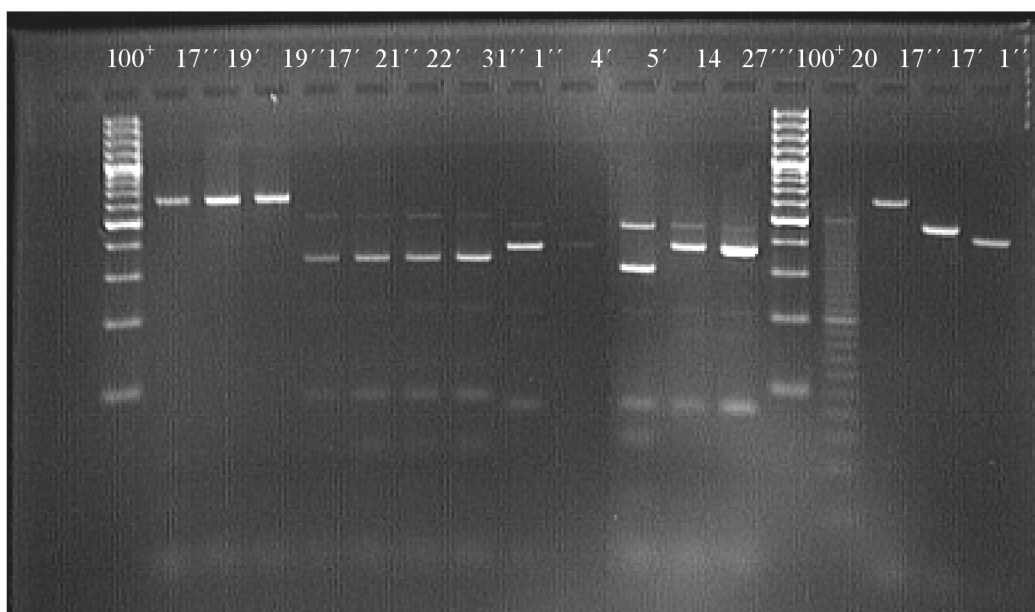


Obrázek č. 18: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *HaeIII* (délkový standard - 100⁺ bp, 1 - 16 - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 2,9,19 – pozitivní kontrola)

Enzym *HaeIII* (obr č. 18) nenaštěpil vzorky vinných kvasinek 17, 19 a 20, neboť fragmenty amplifikované pomocí primerů ITS1 a ITS4 neobsahují sekvenci, kterou tento enzym štěpí. Vzorky 1, 4, 15, 8, 14, 7, 2, 5, 12 byly štěpeny na dva fragmenty a vzorky 9 a 16 byly štěpeny na tři fragmenty. Podle délek restrikčních fragmentů jsme schopni rozdělit vzorky na čtyři skupiny (viz. tabulka č. 8). Jedna skupina zahrnuje vzorky 1, 4, 15, 8, 14, 7 a do další skupiny byly zařazeny vzorky 2, 5, 12. Vzorky 9 a 16 tvoří zbývající dvě skupiny.

Tabulka č. 8: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *HaeIII*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
1	380+90
4	380+90
15	380+90
8	380+90
14	380+90
7	380+90
2	300+80
5	300+80
12	300+80
9	320+90+60
17	n
20	n
19	n
16	420+80+60



Obrázek č. 19: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *HaeIII* (délkový standard - 100⁺ bp, 17'' - 27''' - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 17'', 17', 1'' – pozitivní kontrola)

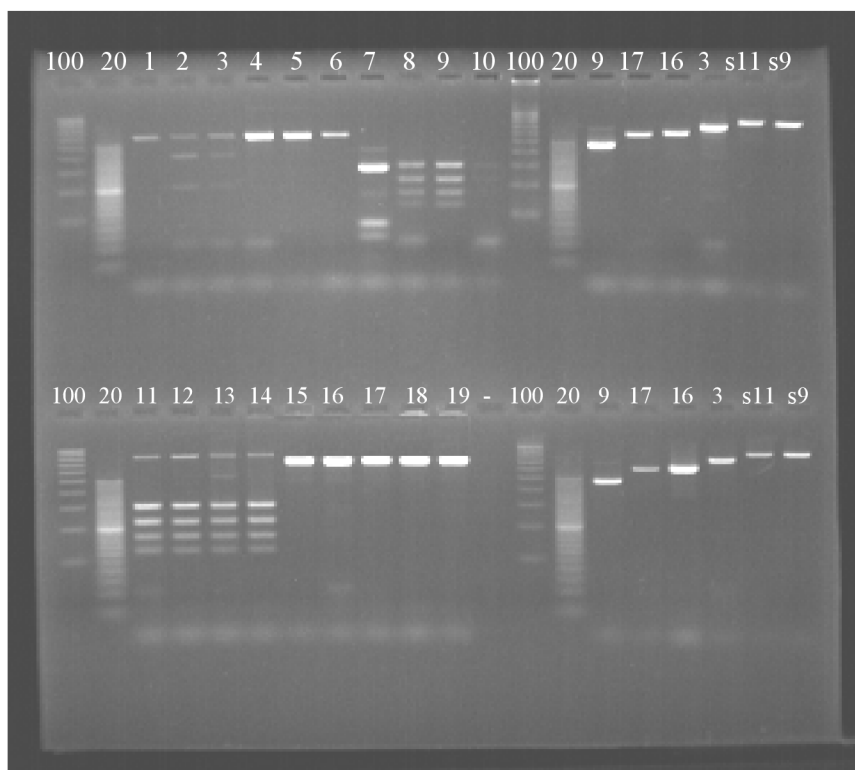
Enzym *HaeIII* (viz. obr. 19) nenaštěpil vzorky vinných kvasinek 17'', 19' a 19'', neboť fragment amplifikovaný pomocí primerů ITS1 a ITS4 neobsahuje sekvenci, kterou tento enzym štěpí. V tabulce č. 9 jsou uvedeny délky fragmentů DNA vzorků vinných kvasinek po restrikční analýze. Ze srovnání elektroforeogramů (obr. č. 18, 19) nepřečištěných a přečištěných vzorků vinných kvasinek, je zřejmé, že shodně naštěpenou DNA měly kvasinky 1'' = 1, 4' = 4, 5' = 5, 14 = 14, 17'' = 17, 19' a 19'' = 19, 9 = 17', 21'', 22', 31''.

Na základě porovnání délek restrikčních fragmentů vzorků vinných kvasinek a typových kvasinek byly vzorky 1, 1'', 4, 4', 7, 8, 14, 15 a 27''' identifikovány jako *Pichia*.

fermentans a vzorky 2, 5, 5' a 12 byly identifikovány jako *Pichia membranifaciensis*. Vzorky 17, 17" , 19 a 20 byly identifikovány jako *Rhodotorula glutinis* a vzorek 16 byl zařazen pouze do rodu *Rhodotorula*, protože pro něj nebyla nalezena typová kvasinka. Do rodu *Candida* byly zařazeny vzorky 9, 17', 21", 22' a 31" a to na základě délky produktu po PCR (500 bp).

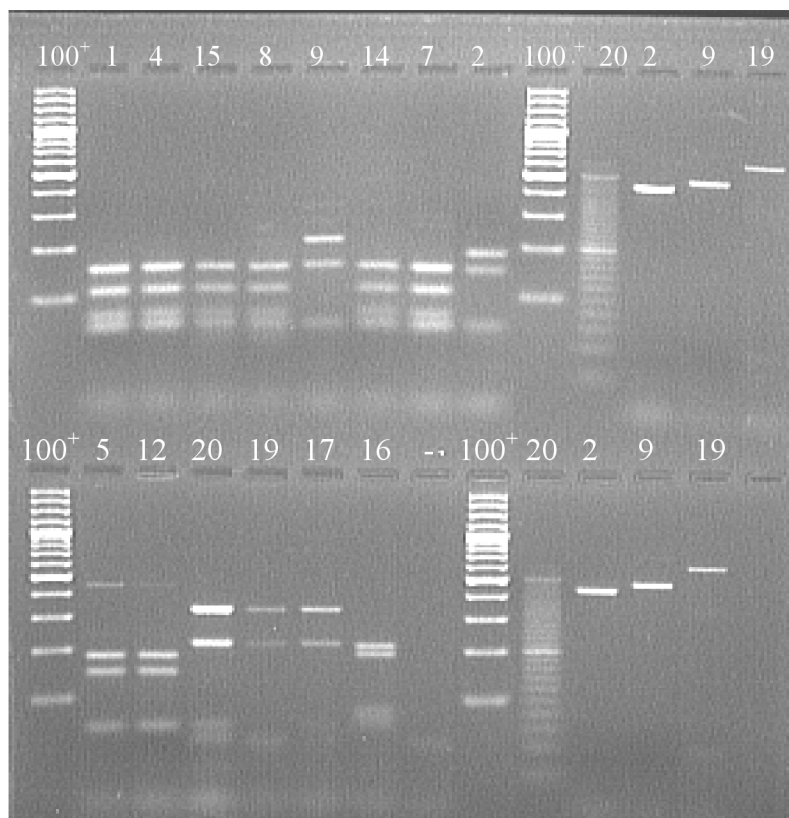
Tabulka č. 9: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *HaeIII*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
17"	n
19'	n
19"	n
17'	350+100
21"	350+100
22'	350+100
31"	350+100
1"	380+90
4'	380+90
5'	380+90
14	380+90
27""	380+90



Obrázek č. 20: Ukázka elektroforeogramu po štěpení typových kvasinek endonukleázou *HaeIII* (délkový standard - 100⁺ bp a 20 bp, 1 – 19 DNA - typových kvasinek po restrikční analýze, 9, 17, 16, 3, s11, s9 – pozitivní kontrola)

4.3.3. Restrikční analýza pomocí endonukleázy *TaqI*



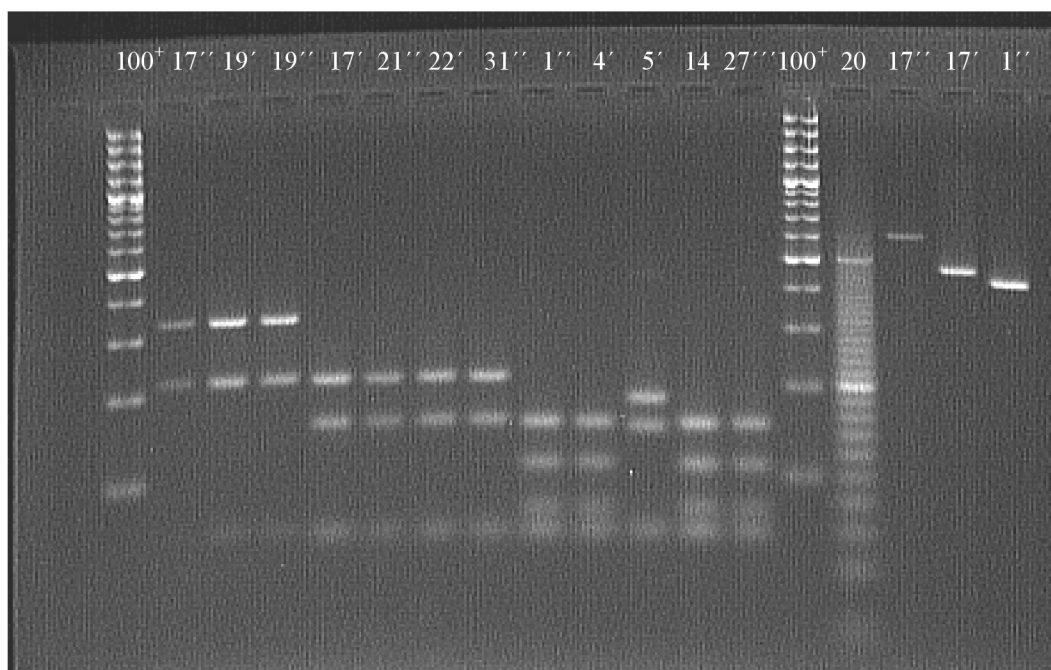
Obrázek č. 21: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *TaqI* (délkový standard - 100⁺ bp, 1 - 16 - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 2, 9, 19 – pozitivní kontrola)

Z elektroforeogramu (obr. č. 21) je patrné, že enzym *TaqI* naštěpil DNA všech vzorků vinných kvasinek a tyto vzorky jsou rozděleny na 4 skupiny podle délek restrikčních fragmentů (viz. tabulka č. 10).

Ze srovnání délek restrikčních fragmentů vinných kvasinek s délkami restrikčních fragmentů typových kvasinkových kmenů byly vzorky 1, 4, 7, 8, 14, 15 identifikovány jako *Pichia fermentans* a vzorky 2, 5, 12 byly identifikovány jako *Pichia membranifaciens*. Vzorky 17, 19, 20 byly zařazeny jako *Rhodotorula glutinis* a vzorek 16 byl zařazen do rodu *Rhodotorula*. Vzorek 9 byl identifikován jako rod *Candida*.

Tabulka č. 10: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *TaqI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
1	160+120+80+60
4	160+120+80+60
15	160+120+80+60
8	160+120+80+60
14	160+120+80+60
7	160+120+80+60
2	190+160+70
5	190+160+70
12	190+160+70
9	240+160+60
17	340+220+60
20	340+220+80+60
19	340+220+80+60
16	220+200+80+60



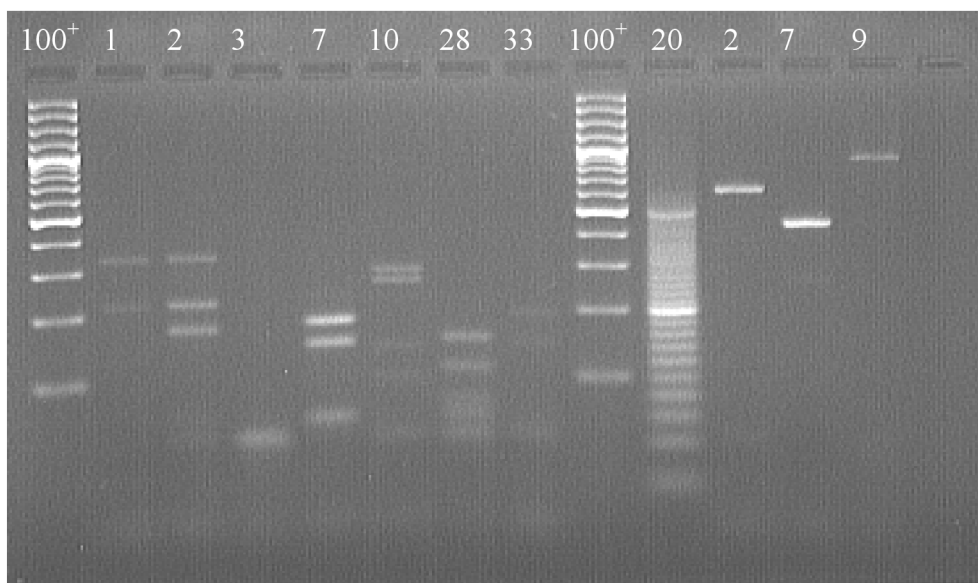
Obrázek č. 22: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *TaqI* (délkový standard - 100⁺ bp, 17'' - 27''' - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 17'', 17', 1'' – pozitivní kontrola)

Enzymem *TaqI* byly naštěpeny všechny vzorky vinných kvasinek (obr. č. 22). Z tabulky č. 11, kde jsou uvedeny délky fragmentů DNA po restrikční analýze, vyplývá, že shodně naštěpenou DNA měly kvasinky 1'' = 1, 4' = 4, 5' = 5, 14 = 14, 17'' = 17, 19' a 19'' = 19, 9 = 17', 21'', 22', 31''. Kvasinky 1'', 4', 27''' byly identifikovány jako *Pichia fermentans* a kvasinka 5' byla identifikována jako *Pichia membranifaciensis*. Jako *Rhodotorula glutinis* byla identifikována kvasinka 17''. Vzorky 17', 21'', 22' a 31'' byly zařazeny do rodu *Candida*,

protože mají délku ampifikované DNA po PCR 500 bp, ale jinak nebyla nalezena shoda po restrikční analýze u těchto vzorků a jedinou typovou kvasinkou *C. krusei*.

Tabulka č. 11: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *TaqI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
17''	340+220+60
19'	340+220+60
19''	340+220+60
17'	220+160+60
21''	220+160+60
22'	220+160+60
31''	220+160+60
1''	160+120+80+60
4'	160+120+80+60
5'	180+160+60
14	160+120+80+60
27'''	160+120+80+60



Obrázek č. 23: Ukázka elektroforeogramu po štěpení typových kvasinek endonukleázou *TaqI* (délkový standard - 100⁺ bp, 1 – 33 DNA - typových kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 2, 7, 9 – pozitivní kontrola)

4.3.4. Restrikční analýza pomocí endonukleázy *HhaI*

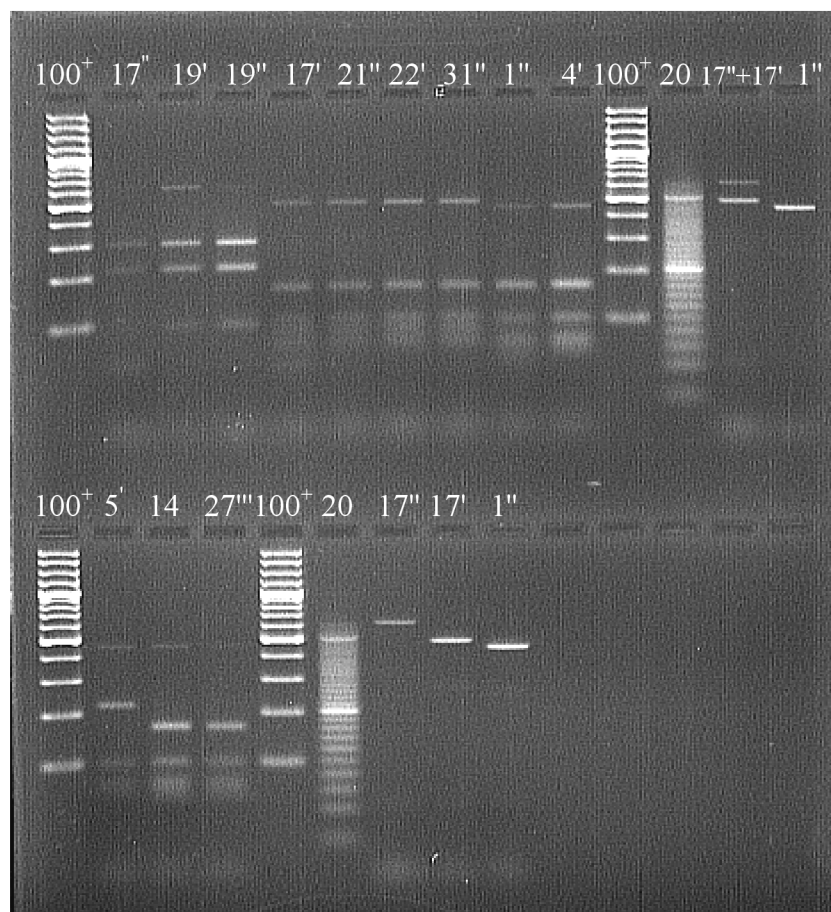


Obrázek č. 24: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *HhaI* (dévkový standard - 100⁺ bp, 1 - 16 - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, dévkový standard - 20 bp, 2, 9, 19 – pozitivní kontrola)

Restrikce pomocí enzymu *HhaI* proběhla u všech vzorků vinných kvasinek. Z elektroforeogramu (obr. č. 24) je patrné rozdělení vzorků vinných kvasinek na 4 skupiny podle délek restrikčních fragmentů (viz. tabulka č. 2). Po srovnání délek restrikčních fragmentů vinných kvasinek a typových kvasinek se došlo ke stejnému závěru jako v kapitole 4.3.3.

Tabulka č. 12: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *HhaI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
1	180+110+80
4	180+110+80
15	180+110+80
8	180+110+80
14	180+110+80
7	180+110+80
2	220+110+80
5	220+110+80
12	220+110+80
9	180+110+80
17	300+220+100
20	300+220+100
19	300+220+100
16	270+210+100

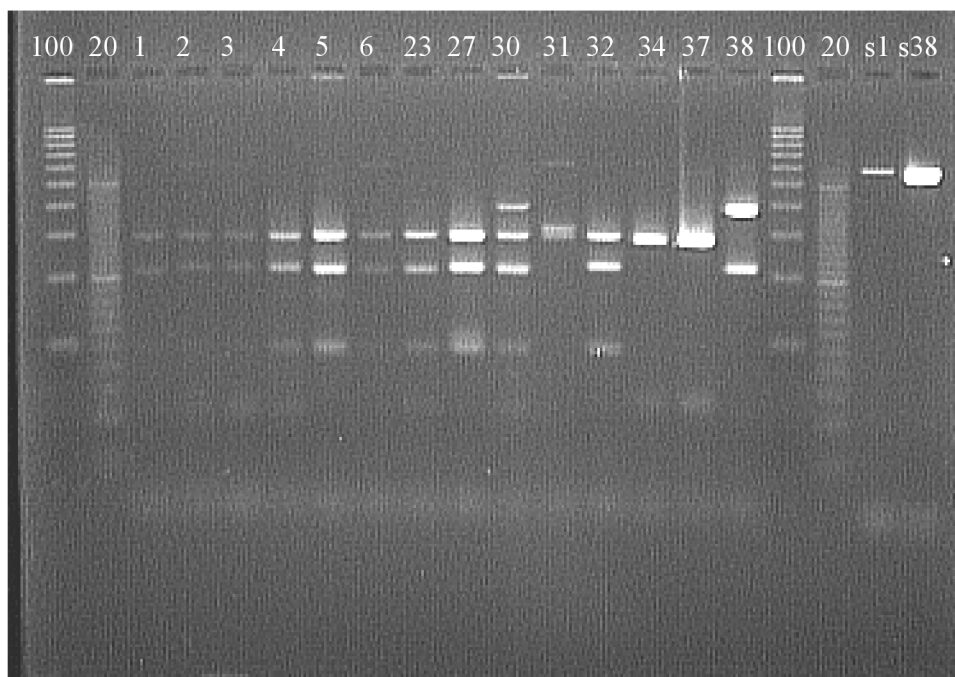


Obrázek č. 25: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *HhaI* (délkový standard - 100⁺ bp, 17'' - 27''' - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 17'', 17', 1'' – pozitivní kontrola)

Z elektroforeogramu (obr. č. 25) je patrné, že pomocí enzymu *HhaI* proběhla restrikce u všech vzorků vinných kvasinek. V tabulce č. 13 jsou uvedeny délky fragmentů DNA vzorků po restrikční analýze.

Tabulka č. 13: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *HhaI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
17"	300+220+100
19'	300+220+100
19"	300+220+100
17'	180+100+80
21"	180+100+80
22'	180+100+80
31"	180+100+80
1"	180+100+80
4'	180+100+80
5'	220+100+80
14	220+100+80
27"	220+100+80



Obrázek č. 26: Ukázka elektroforeogramu po štěpení typových kvasinek endonukleázou *HhaI* (délkový standard - 100⁺ bp a 20 bp, 1 – 38 - DNA typových kvasinek po restrikční analýze, s1, s38 – pozitivní kontrola)

4.3.5. Restrikční analýza pomocí endonukleázy *HpaII*

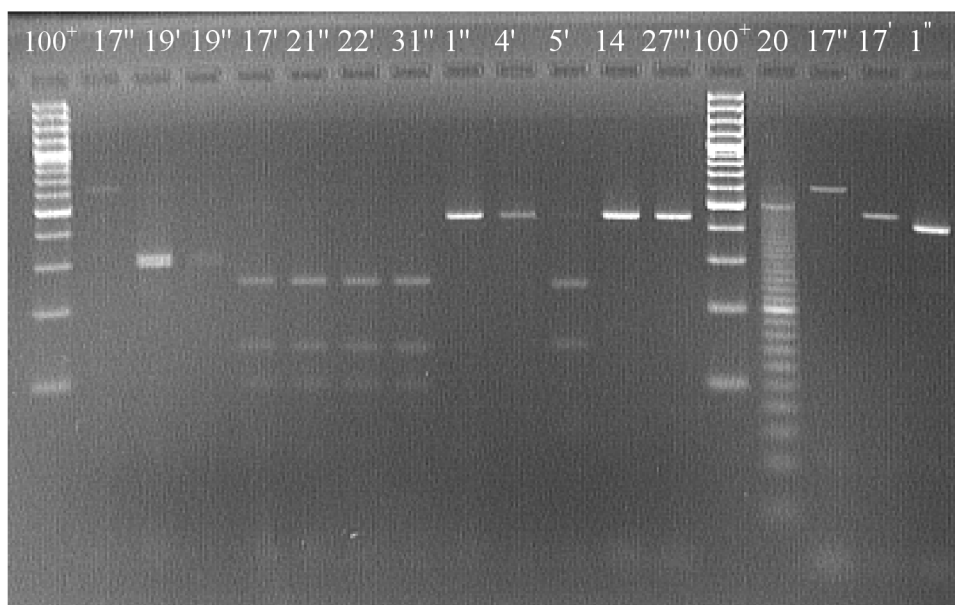


Obrázek č. 27: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *HpaII* (délkový standard - 100⁺ bp, 1 - 16 - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 2, 9, 19 – pozitivní kontrola)

Restrikce pomocí enzymu *HpaII* (obr. č. 27) neproběhla u vzorků vinných kvasinek 1, 4, 15, 8, 14, 7, 17, 20, 16. Enzym *HpaII* se jeví jako nevhodný enzym pro restrikci fragmentu amplifikovaného pomocí primerů ITS1 a ITS4, neboť neobsahuje potřebnou sekvenci, kterou tento enzym specificky štěpí. V tabulce č. 14 jsou opět uvedeny délky fragmentů DNA vzorků vinných kvasinek po restrikční analýze. Vzorky 2, 5, 12 a 9 jsou naštěpeny stejně na dva fragmenty. Kvasinka 9 se štěpila na 250 bp a 140bp. Vzorek 16 je také naštěpen na dva fragmenty.

Tabulka č. 14: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *HpaII*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
1	n
4	n
15	n
8	n
14	n
7	n
2	250+140
5	250+140
12	250+140
9	250+140
17	n
20	n
19	320+300
16	n

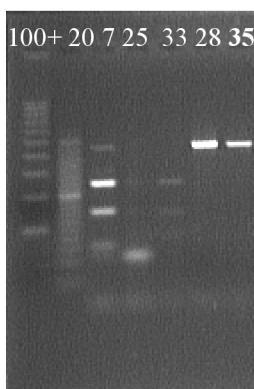


Obrázek č. 28: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *HpaII* (délkový standard - 100⁺ bp, 17'' - 27''' - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 17'', 17', 1'' – pozitivní kontrola)

Z elektroforeogramu je patrné, že enzym *HpaII* nenaštěpil pět vzorků vinných kvasinek (17'', 1'', 4', 14, 27'''). Ze srovnání elektroforeogramů (obr. č. 27, 28) původních a přečištěných vzorků vinných kvasinek, vyplývá, že shodně naštěpenou DNA měly kvasinky: 1'' = 1, 4' = 4, 5' = 5, 14 = 14, 17'' = 17, 19' a 19'' = 19. Kvasinky 17', 21'', 22' a 31'' se štěpily na tři fragmenty délek 260 bp, 150 bp a 100bp. V tabulce č. 15 jsou uvedeny délky fragmentů DNA. Tyto kvasinky se liší o 100 bp od kvasinky 9.

Tabulka č. 15: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *HpaII*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
17"	n
19'	320+300
19"	320+300
17'	260+150+100
21"	260+150+100
22'	260+150+100
31"	260+150+100
1"	n
4'	n
5'	250+140
14	n
27'''	n



Obrázek č. 29: Ukázka elektroforeogramu po štěpení typových kvasinek endonukleázou *HpaII* (délkový standard - 100⁺ bp a 20 bp, 7 – 35 - DNA typových kvasinek po restrikční analýze)

4.3.6. Restrikční analýza pomocí endonukleázy *MseI*

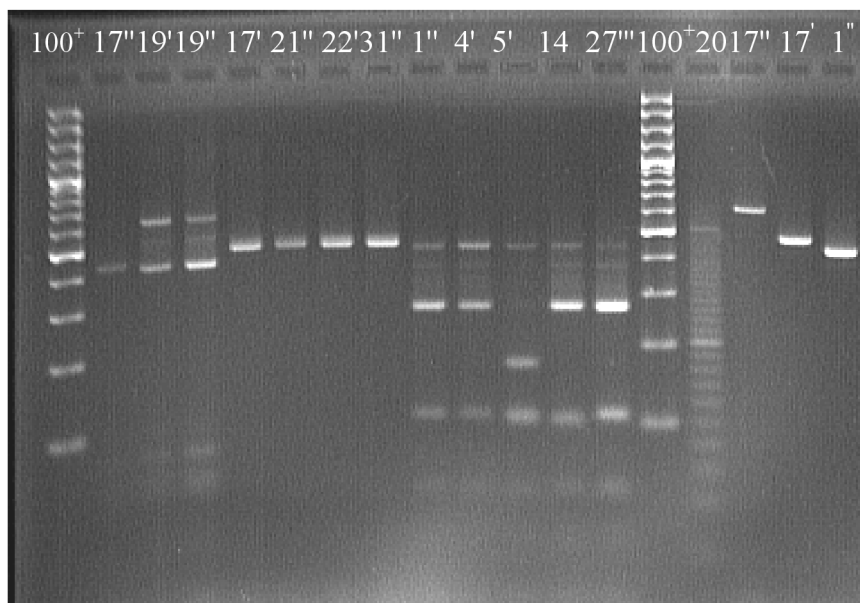


Obrázek č. 30: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *MseI* (délkový standard - 100⁺ bp, 1 - 16 - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 2, 9, 19 – pozitivní kontrola)

Restrikční analýza pomocí enzymu *MseI* (obr.č. 30) neproběhla u vzorku vinné kvasinky 9. U ostatních vzorků došlo ke štěpení na dva fragmenty. A podle délek restrikčních fragmentů byly tyto vzorky rozděleny na čtyři skupiny (viz. tabulka č. 16).

Tabulka č. 16: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *MseI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
1	280+110
4	280+110
15	280+110
8	280+110
14	280+110
7	280+110
2	180+110
5	180+110
12	180+110
9	n
17	450+80
20	450+80
19	420+80
16	380+260

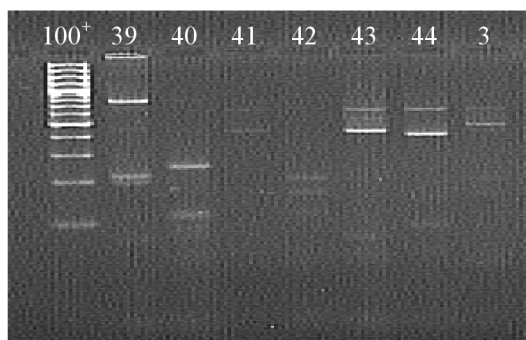


Obrázek č. 31: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *MseI* (délkový standard - 100⁺ bp, 17'' - 27''' - DNA vinných kvasinek po restriční analýze, délkový standard - 20 bp, 17'', 17', 1'' – pozitivní kontrola)

Restriční analýza pomocí enzymu *MseI* neproběhla u vzorků vinných kvasinek 17', 21'', 22', 31''. Fragment po PCR tedy neobsahuje specifickou sekvenci pro tento enzym. Ze srovnání elektroforeogramů (obr. č. 30 a 31) původních a přečištěných vzorků vinných kvasinek, vyplývá, že shodně naštěpenou DNA měly kvasinky 1'' = 1, 4' = 4, 5' = 5, 14 = 14, 17'' = 17, 19' a 19'' = 19. V tabulce č. 17 jsou uvedeny délky fragmentů DNA vzorků vinných kvasinek po restriční analýze.

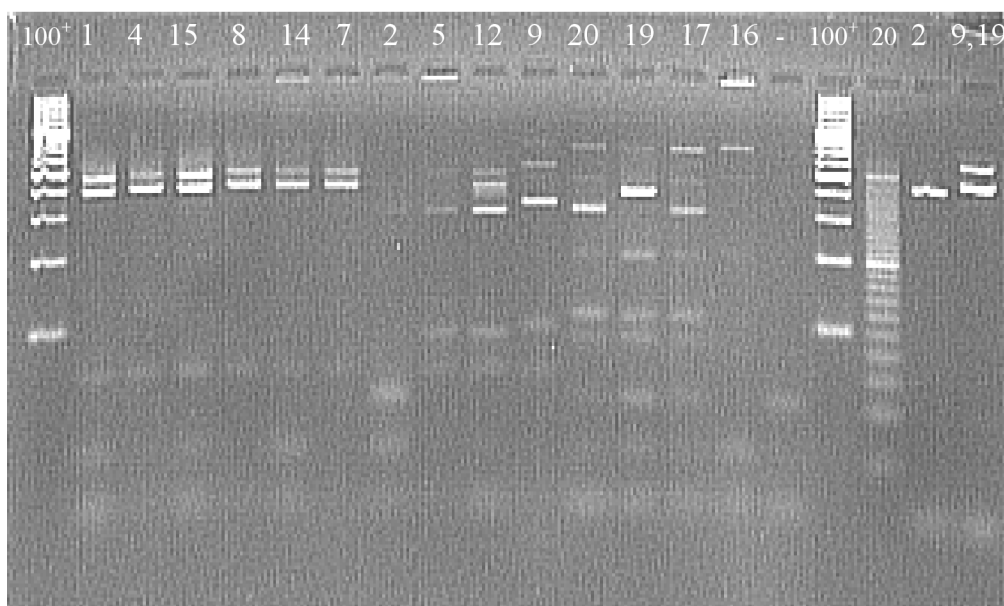
Tabulka č. 17: Vyhodnocení restriční analýzy s endonukleázou *MseI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restriční analýze (bp)
17''	400
19'	400+80
19''	400+80
17'	n
21''	n
22'	n
31''	n
1''	280+110
4'	280+110
5'	180+110
14	280+110
27'''	280+110



Obrázek č. 32: Ukázka elektroforeogramu po štěpení typových kvasinek endonukleázou *MseI* (délkový standard - 100⁺ bp, 39 – 3 - DNA typových kvasinek po restrikční analýze)

4.3.7. Restrikční analýza pomocí endonukleázy *AluI*



Obrázek č. 33: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *AluI* (délkový standard - 100⁺ bp, 1 - 16 - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 2, 9, 19 – pozitivní kontrola)

Z elektroforeogramu (obr. č. 33) je patrné, že vzorky vinných kvasinek lze po restrikční analýze rozdělit na 5 skupin podle délek restrikčních fragmentů. První skupina zahrnuje vzorky 1 – 7, druhá skupina obsahuje vzorky 2 – 12, třetí skupina je složena ze vzorku 9, 4. skupina obsahuje vzorky 17 – 19. Do páté skupiny je zahrnut pouze vzorek 16, který nebyl pomocí enzymu *AluI* štěpen, protože fragment po PCR neobsahuje sekvenci, kterou štěpí tento enzym. V tabulce č. 18 jsou uvedeny délky fragmentů DNA vzorků vinných kvasinek po restrikční analýze.

Tabulka č. 18: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *AluI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
1	380
4	380
15	380
8	380
14	380
7	380
2	300+100
5	300+100
12	300+100
9	350+110
17	350+120+100
20	350+120+100
19	350+120+100
16	n

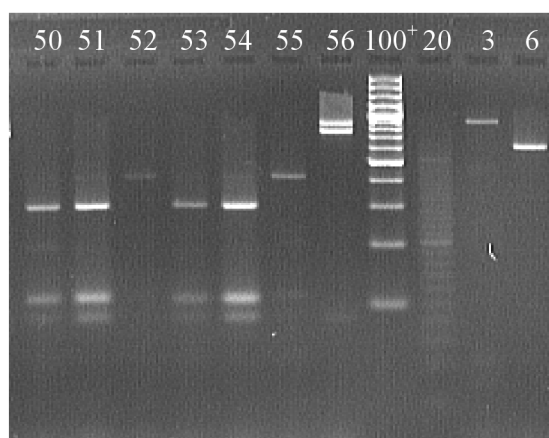


Obrázek č. 34: Elektroforeogram po štěpení vzorků vinných kvasinek endonukleázou *AluI* (délkový standard - 100⁺ bp, 17'' - 27''' - DNA vinných kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 20 bp, 17'', 17', 1'' – pozitivní kontrola)

Z elektroforeogramu (obr. č. 34) je patrné, že enzym *AluI* štěpí všechny vzorky vinných kvasinek. Ze srovnání elektroforeogramů (obrázek č. 33 a 34) nepřechištěných a prechištěných vzorků vinných kvasinek, vyplývá, že shodně naštěpenou DNA měly kvasinky 1'' = 1, 4' = 4, 5' = 5, 14 = 14, 17'' = 17, 19' a 19'' = 19. V tabulce č. 19 jsou uvedeny délky fragmentů DNA vzorků vinných kvasinek po restrikční analýze.

Tabulka č. 19: Vyhodnocení restrikční analýzy s endonukleázou *AluI*

Číslo vzorku	Délky fragmentů po restrikční analýze (bp)
17''	350+120+100
19'	380+120+80
19''	380+120+80
17'	350+100
21''	350+100
22'	350+100
31''	350+100
1''	380
4'	380
5'	300+100
14	380
27'''	380



Obrázek č. 35: Ukázka elektroforeogramu po štěpení typových kvasinek endonukleázou *AluI* (50 – 56 - DNA typových kvasinek po restrikční analýze, délkový standard - 100⁺ bp a 20 bp, 3, 6 – pozitivní kontrola)

4.3.8. Zhodnocení výsledků restrikční analýzy

Byly porovnány délky restrikčních fragmentů izolovaných vinných kvasinek s délkami restrikčních fragmentů typových kvasinkových kmenů pomocí sedmi endonukleáz (*HinfI*, *HaeIII*, *TaqI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *AluI*).

Ze srovnání elektroforeogramů původních a přečištěných vzorků vinných kvasinek, vyplývá, že shodně naštěpenou DNA měly kvasinky: 1'' = 1, 4' = 4, 5' = 5, 14 = 14, 17'' = 17, 19' a 19'' = 19, 9 = 17', 21'', 22', 31''.

Na základě provedené restrikční analýzy byly vzorky vinných kvasinek 1, 1'', 4, 4', 7, 8, 14, 15, 27''' identifikovány jako *Pichia fermentans*. Vzorky vinných kvasinek 2, 5, 5', 12 byly zařazeny do kmene *Pichia membranifaciens*. Vzorky vinných kvasinek 17, 17'', 19, 19', 19'' 20 byly identifikovány jako *Rhodotorula glutinis*. Vzorek 16 byl zařazen do rodu *Rhodotorula* a nebyl blíže identifikován, neboť pro něj nebyla nalezena typová kvasinka.

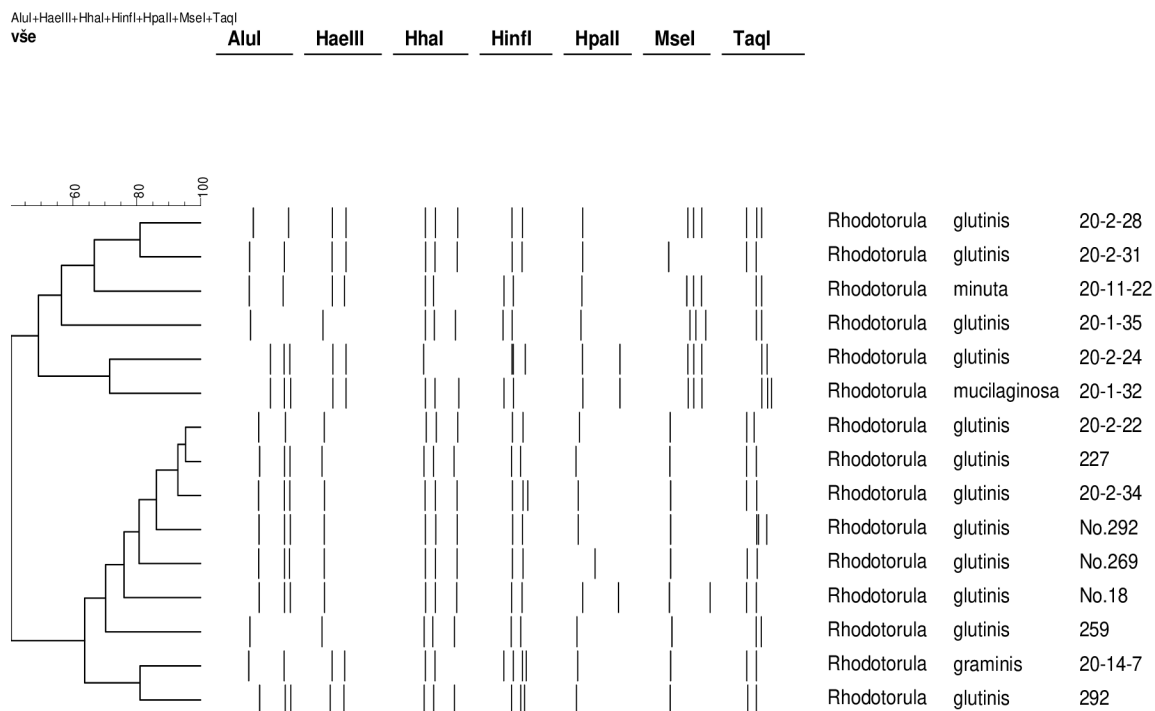
Vzorky vinných kvasinek 9, 17', 21'', 22', 31'' není zatím možné zařadit, protože PCR produkt byl délky 500 bp a pouze jedna typová kvasinka (*Candida krusei*) měla stejnou délku po PCR, ale po restrikční analýze nebyla nalezena shoda mezi touto typovou kvasinkou a

vinnými kvasinkami. Následujícím práce by se proto měla zaměřit na identifikaci těchto nezařazených kvasinek a rozšířit analýzy o typové kvasinkami rodu *Candida*.

4.3.9. Dendrogramy

Pro tvorbu dendrogramů (fylogenetických stromů) se použil software Bionumerics, který lze rozdělit na tři základní funkční části. První část slouží pro tvorbu databáze kmenů kvasinek rodu *Rhodotorula* a *Pichia*. Druhá část slouží ke zpracování fotografií gelů po restriční analýze pomocí sedmi enzymů (*AluI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII*, *MseI*, *TaqI*). Na gelech byly rozděleny a vizualizovány DNA fragmenty. Z obrázků gelů byly získány denzitometrické křivky a polohy rozdělených fragmentů (proužků). V třetí části se provedlo statistické vyhodnocení dat z obrázků, stanovily se velikosti fragmentů a byl sestaven dendrogram.

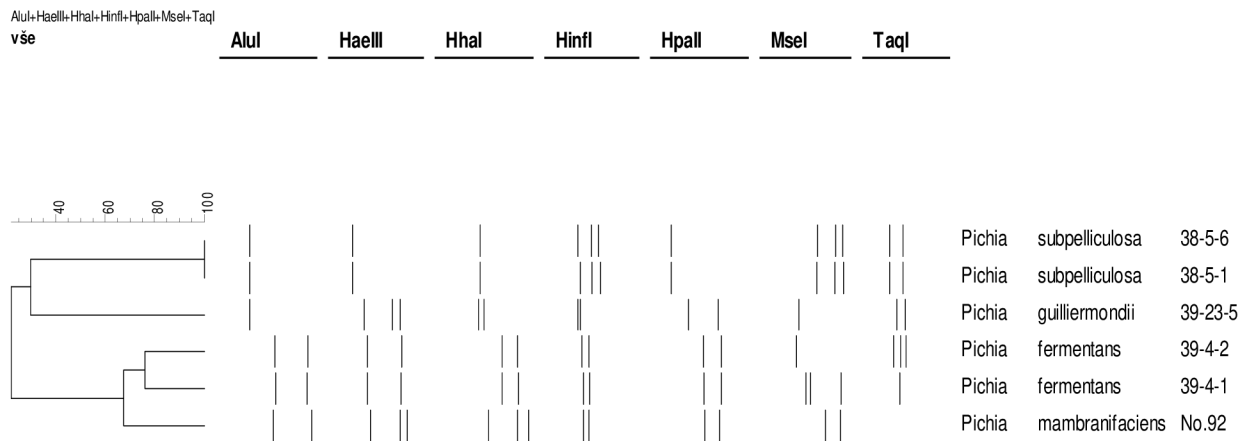
Pro sestavení dendrogramu byla použita metoda shlukové analýzy UPGMA. Tolerance pozice fragmentů byla na úrovni 1.5 %. Dále byl zvolen Jaccardův korelační koeficient, který porovnává fragmenty v závislosti na jejich poloze a počtu. Zpracovávány byly typové kvasinky a vzorky vinných kvasinek patřící do rodu *Rhodotorula* a *Pichia*. Vzniklá chyba v interpretaci dendrogramů má původ ve vyhodnocení gelů pomocí programu Bionumerics. Posuny ve fragmentech DNA typových kvasinek a vzorků vinných kvasinek jsou způsobené tím, že byly definovány z několika gelů. Pro vyhodnocení byl tento software použit poprvé.



Obrázek č. 36: Dendrogram kmenů rodu *Rhodotorula* – typové kvasinky.

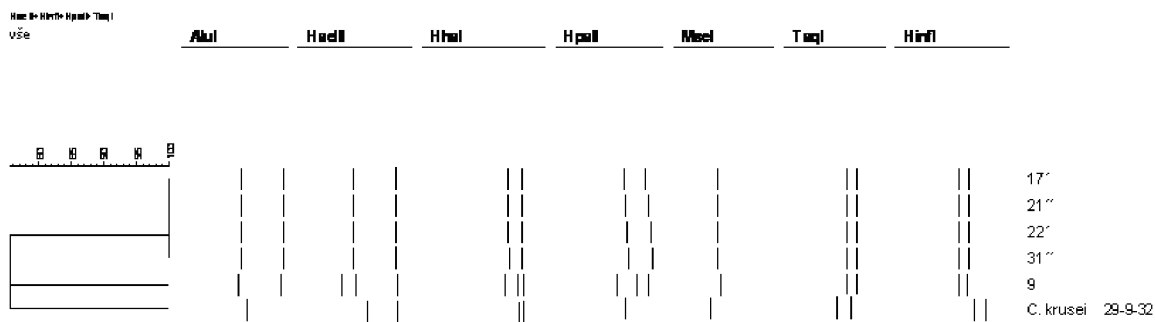
Z dendrogramu (obr. č. 36) je patrné, že rod *Rhodotorula* se rozdělil na dvě velké skupiny. První skupina obsahuje rod *Rh. glutinis* s označením kmene 20-2-28, 20-2-31, 20-1-35, 20-2-34 a rod *Rh. minuta* s označením kmene 20-11-22, rod *Rh. mucilaginoso* s označením kmene 20-1-32. Druhá skupina obsahuje rod *Rh. glutinis* s značením kmenů 20-2-22, 227, 20-2-34,

No. 292, No. 269, No.18, 259, 292. a rod *Rh. graminis* s označením kmene 20-14-7. První skupina se dále dělí na dvě podskupiny . První podskupina obsahuje rod *Rh. glutinis* s označením kmene 20-2-28, 20-2-31, 20-1-35 a rod *Rh. minuta* s označením kmene 20-11-22 .Všechny zmíněné kvasinky v 1. podskupině jsou odlišitelné na úrovni kmenů. Druhá podskupina obsahuje rod *Rh. glutinis* s označením kmene 20-2-24 a rod *Rh. mucilaginoso* s označením kmene 20-1-32, které jsou opět odlišitelné na úrovni kmene. Druhá skupina se opět dělí na dvě podskupiny. První podskupina obsahuje rod *Rh. glutinis* s označením kmene 20-2-22, 227, 20-2-34, No. 292, No. 269, No. 18 a 259. Všechny tyto kvasinky jsou odlišitelné na úrovni kmenů. Druhá podskupina obsahuje rod *Rh. glutinis* s označením kmene 292 a rod *Rh. graminis* s označením kmene 20-14-7. Opět jsou tyto kvasinky odlišitelné na úrovni kmenu. Je možné konstatovat , že kvasinky rodu *Rhodotorula* je touto metodou možné rozlišit až na úroveň kmene, což se nám nepodařilo u dalšího analyzovaného rodu *Pichia*.



Obrázek č. 37: Dendrogram kmenů rodu *Pichia* – typové kvasinky

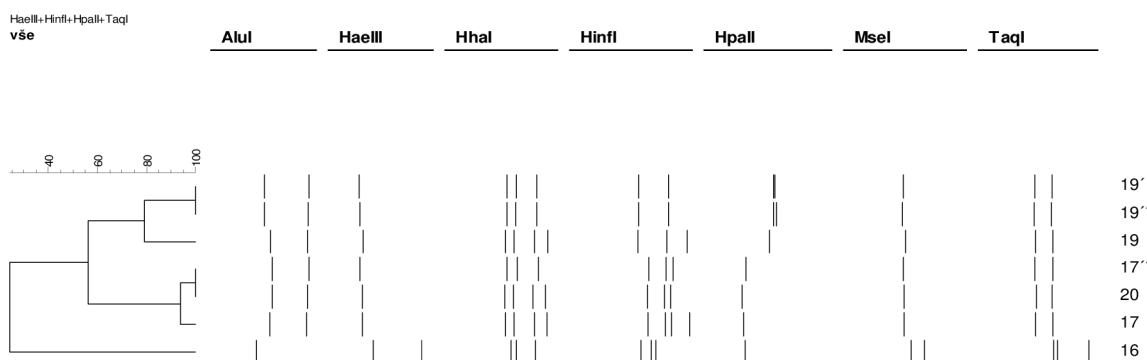
Z dendrogramu (obr. č. 37) je patrné, že se rod *Pichia* rozdělil na dvě velké skupiny: První obsahuje rody: *P. subpelliculosa* s označením kmene 38-5-6 a 38-5-1, které jsou totožné a *P. guilliermondii* s označením kmene 39-23-5, která se od nich odlišuje. Druhá skupina obsahuje rody *P. fermentans* s označením kmene 39-4-2, 39-4-1 a *P. membranifaciens* s označením kmene No. 92, která se dále dělí na dvě podskupiny. První podskupina v níž je *P. fermentans* s označením kmene 39-4-2 a 39-4-1, které se od sebe liší. Druhá podskupina obsahuje *P. membranifaciens* s označením kmene No. 92. V tomto případě jsme schopni identifikovat kvasinky na úrovni druhu.



Obrázek č. 38: Dendrogram rodu *Candida* – vzorky vinných kvasinek

Vzorky vinných kvasinek 17', 21'', 22', 31'' a 9 zatím nejsme schopni zařadit, nicméně byla nalezena shoda v délce amplifikované DNA těchto vzorků s délkou amplifikované DNA typové kvasinky *Candida krusei* - 500 bp. Po restriční analýze ale nebyla nalezena shoda mezi touto typovou kvasinkou a vinnými kvasinkami. Pro zařazení těchto kvasinek je nutné analyzovat další typové kvasinky rodu *Candida*, aby bylo možné potvrdit nebo vyvrátit naši hypotézu, že do tohoto rodu opravdu patří.

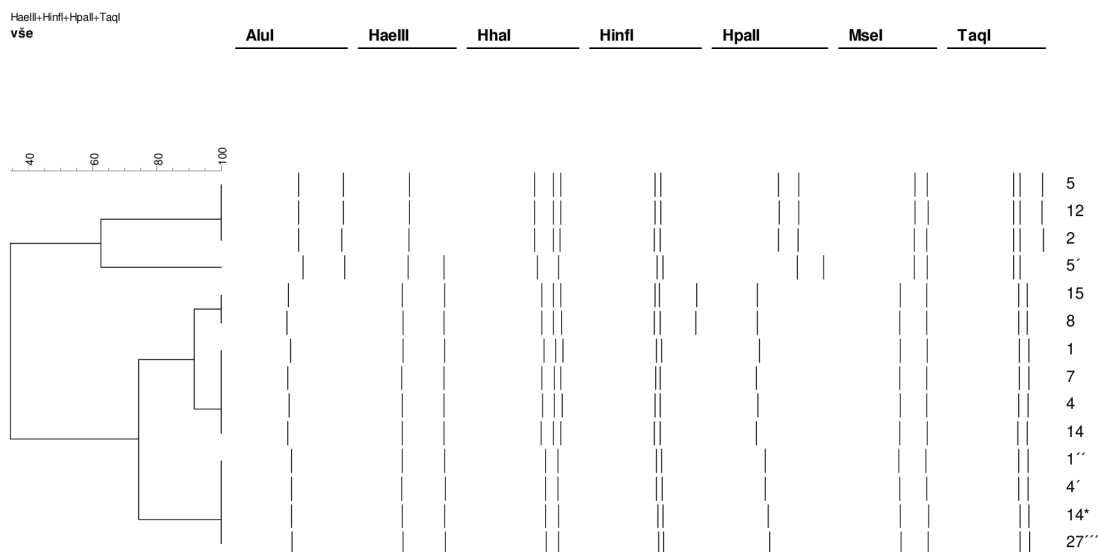
Nicméně byl vytvořen dendrogram (obr. č. 38), z něhož je patrné, že se tato skupina (rod *Candida*) rozdělil na dvě skupiny. První skupina obsahuje vzorky vinných kvasinek 17', 21'', 22', 31'', které jsou totožné. Druhá skupina obsahuje vzorek 9.



Obrázek č. 39: Dendrogram rodu *Rhodotorula* – vzorky vinných kvasinek

Na základě provedené restriční analýzy a porovnání délky restričních fragmentů izolovaných vinných kvasinek s délkami restričních fragmentů typových kvasinkových kmenů pomocí sedmi endonukleáz (*HinfI*, *HaeIII*, *TaqI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *AluI*) byly identifikovány vzorky vinných kvasinek 17, 17'', 19, 19', 19'' 20 jako *Rhodotorula glutinis*. Vzorek 16 byl zařazen do rodu *Rhodotorula*.

V dendrogramu (obr. č. 39) je patrná velká odlišnost vzorku 16 od všech ostatních vzorků vinných kvasinek, které tvoří jednu skupinu, dále rozdělenou na dvě podskupiny. První podskupina obsahuje kvasinky 19, 19' a 19''. Kvasinky 19' a 19'' jsou totožné na kmenové úrovni, kvasinka 19 se od nich liší. Druhá podskupina obsahuje vzorky vinných kvasinek 17'', 20 a 17. Kvasinka 17'' i 20 jsou totožné v rámci kmene a kvasinka 17 je odlišná.



Obrázek č. 40: Dendrogram rodu *Pichia* – vzorky vinných kvasinek

Na základě porovnání délky restričních fragmentů izolovaných vinných kvasinek s délkami restričních fragmentů typových kvasinkových kmenů pomocí sedmi endonukleáz (*HinfI*, *HaeIII*, *TaqI*, *MseI*, *HhaI*, *HpaII*, *AluI*) byly vzorky vinných kvasinek 1, 1'', 4, 4', 7, 8, 14, 15, 27''' identifikovány jako *Pichia fermentans*, a vzorky vinných kvasinek 2, 5, 5', 12 byly zařazeny do kmene *Pichia membranifaciens*.

Z dendrogramu (obr. č. 40) je patrné, že rod *Pichia* je rozdělen na dvě skupiny. První skupina obsahuje kvasinky 5, 12, 2 a 5', které jsou dále rozděleny na podskupinu s kvasinkami 5, 12 a 2, které jsou totožné v rámci kmene a mimo tuto podskupinu je zařazena kvasinka 5', která je odlišná od zmíněné podskupiny. Druhá skupina zahrnuje kvasinky 15, 8, 1, 7, 4, 14, 1'', 4', 14* (přečištěný vzorek vinné kvasinky 14), 27''', které se dělí na dvě podskupiny. První podskupina se dále dělí na dvě skupiny kvasinek totožných na kmenové úrovni. Skupinu s kvasinkami 15, 8 a na skupinu s kvasinkami 1, 7, 4 a 14. Druhá podskupina zahrnuje kvasinky 1'', 4', 14* a 27''', které jsou totožné v rámci kmene.

4.4. Vyhodnocení optimalizace metody PCR-RFLP

Aby PCR probíhala optimálně a bylo dosaženo jednoznačných výsledků, je vhodné ověřit podmínky reakce, tj. přesné hodnoty teploty a doby trvání jednotlivých kroků. Pro získání požadovaného produktu, specifčnosti a výtěžku je důležitá koncentrace jednotlivých složek reakční směsi. Kromě *Taq* DNA-polymerázy a primerů obsahuje reakční směs hořčnaté ionty, které tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) rozpoznávaný DNA-polymerázou.

4.4.1. Analýza vlivu různých koncentrací Mg^{2+} na specifčnost PCR

Pro správnou funkci *Taq* – DNA polymerázy jsou nezbytné Mg^{2+} . Hořčnaté ionty interagují nejen s dNTP, ale i s primery, templátovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly. Je třeba ve většině případů stanovit pro každou aplikaci optimální koncentraci hořčnatých iontů empiricky. Příliš vysoká koncentrace některé ze složek reakce může vést k chybám a vzniku nespecifických produktů.

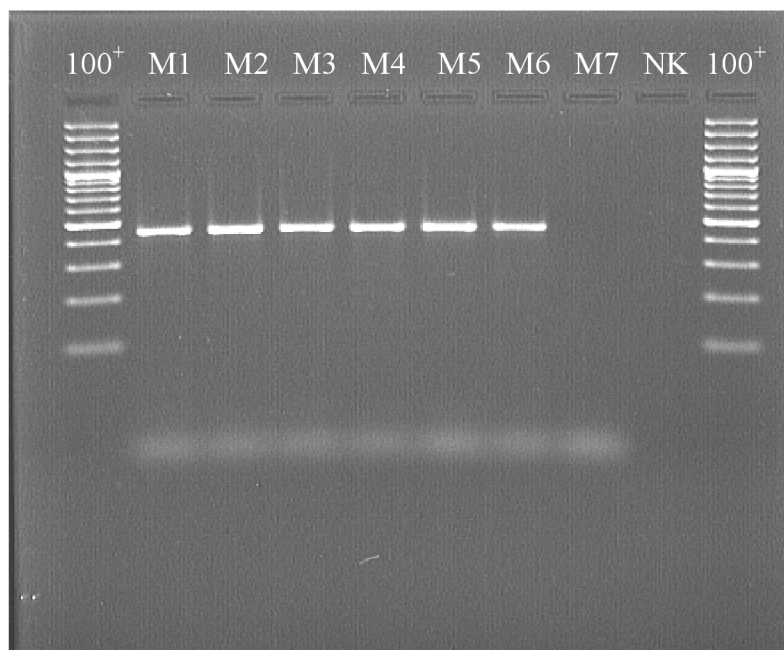
Při použití PCR, kde reakční směs obsahovala $MgCl_2$ v koncentraci 1,5mM, byla pozorována amplifikace nežádoucích nespecifických fragmentů DNA, proto bylo ověřeno zda PCR probíhá za optimální koncentrace Mg^{2+} . Byl připraven různě koncentrovaný $MgCl_2$ naředěním 25 mM $MgCl_2$ (viz. kapitola 3.9.).

Tabulka č. 20: Různě koncentrovaný $MgCl_2$

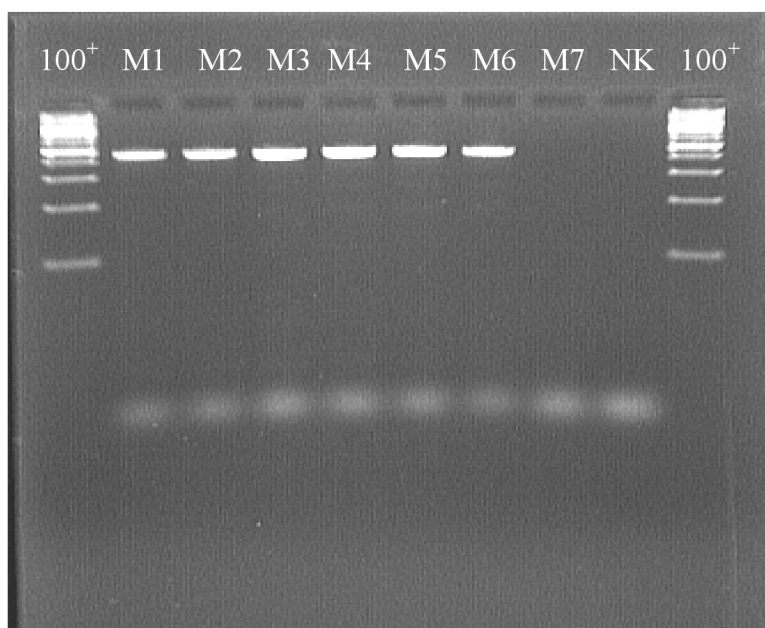
Zk.č.	Koncentrace $MgCl_2$ v PCR směsi
M1	2,0 mM
M2	1,8 mM
M3	1,5 mM
M4	1,2 mM
M5	1,0 mM
M6	0,8 mM
M7	0,0 mM

Analyzovaným kvasinkovým kmenem byla *Pichia fermentans* a *Hanseniaspora uvarum*. Délka amplifikovaného fragmentu po PCR byla 450 bp.

PCR produkty byly detekovány pomocí elektroforézy v 0,7 % agarózovém gelu PCR reakce probíhala také při rozdílných teplotách annealingu (připojení) primerů. Byly zvoleny dvě teploty: 48 °C a 57 °C.

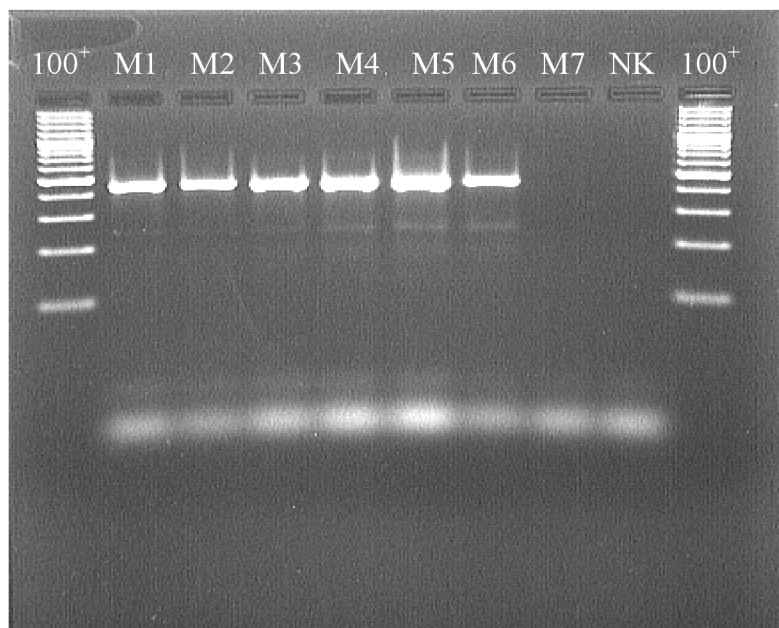


Obrázek č. 41: Elektroforeogram amplifikované DNA *Pichia fermentans* .
(délkový standard - 100⁺ bp, M1 – M7 - označení koncentrace MgCl₂ v PCR směsi, NK – negativní kontrola)

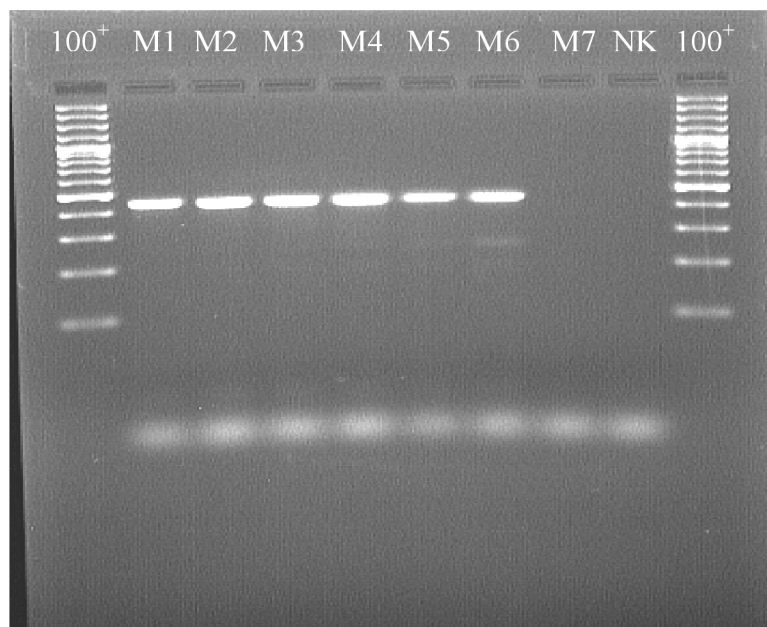


Obrázek č. 42: Elektroforeogram amplifikované DNA *Hanseniaspora uvarum* .
(délkový standard - 100⁺ bp, M1 – M7 - označení koncentrace MgCl₂ v PCR směsi, NK – negativní kontrola)

Teplota annealingu primerů při PCR byla 48 °C. Z elektroforeogramu je patrné, že při 0,0 mM koncentraci MgCl₂ nedošlo k amplifikaci požadovaného fragmentu DNA. U dalších šesti rozdílných koncentrací Mg²⁺ nebyl pozorován ani výskyt nežádoucích fragmentů a ani rozdíl ve výtěžnosti PCR produktu.



Obrázek č. 43: Elektroforeogram amplifikované DNA *Pichia fermentans*.
(délkový standard - 100⁺ bp, M1 – M7 - označení koncentrace MgCl₂ v PCR směsi, NK – negativní kontrola)



Obrázek č. 44: Elektroforeogram amplifikované DNA *Hanseniaspora uvarum*.
(délkový standard - 100⁺ bp, M1 – M7 - označení koncentrace MgCl₂ v PCR směsi, NK – negativní kontrola)

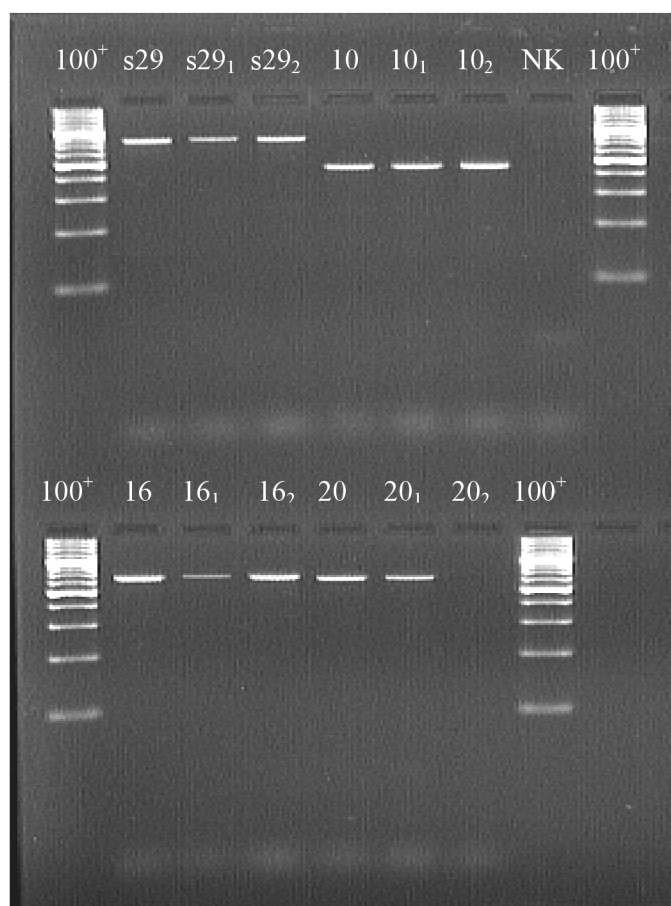
Teplota annealingu primerů při PCR byla 57 °C. Z elektroforeogramu je opět patrné, že při 0,0 mM koncentraci Mg²⁺ neproběhla amplifikace požadovaného fragmentu DNA. U koncentrací 1,5 mM, 1,2 mM, 1,0 mM a 0,8 mM Mg²⁺ u *Pichia fermentans* byly patrné nežádoucí fragmenty. U koncentrace 0,8 mM u *Hanseniaspora uvarum* byl patrný nežádoucí fragment. Se zvyšující se teplotou a snižující se koncentrací Mg²⁺ přibývá nežádoucích fragmentů DNA po PCR. Z výše zmíněných elektroforeogramů je patrné, že námi zvolená koncentrace 1,5 mM MgCl₂ a teplota annealingu primerů 48°C, se jeví jako optimální z hlediska výtěžnosti produktu a specifčnosti reakce.

4.4.2. Optimalizace koncentrace DNA pro PCR

Je vhodné, aby již na začátku do reakční směsi vstupovala DNA stejné koncentrace, abychom získali stejné množství amplikonu. Pak je možné objektivně zhodnotit délky získaných fragmentů. Protože na začátku práce byly analyzované fragmenty široké, což neumožňovalo již zmíněné objektivní zhodnocení délky fragmentu, bylo nutné koncentraci DNA vstupující do PCR sjednotit.

Jak je patrné z výsledku, analyzovaná amplifikovaná DNA všech vzorků – ředěných i neředěných je na gelu v optimální koncentraci. To znamená, že rozdíly v koncentraci vkládané DNA (3 – 40 ng / μ l) do PCR nejsou pro výsledek rozhodující, ale v tomto případě je jednoznačně důvodem kvalita pipetování. S praxí získanou v laboratoři se výsledky zlepšily.

Do reakční směsi na PCR byla přidávána vyředěná DNA na 5 ng / μ l, aby fragmenty DNA po PCR byly rovnoměrně široké, což je důležité z hlediska dále prováděné restriční analýzy.



Obrázek č. 36: Elektroforeogram amplifikované DNA vinných kvasinek. (délkový standard - 100⁺ bp, s29 – 20 - DNA vinných kvasinek po PCR, NK – negativní kontrola)

Analýze byly podrobeny čtyři vzorky vinných kvasinek: s29, 10, 16, 20, u nichž byla proměřena koncentrace vyizolované DNA pomocí přístroje QubitTM Fluorometr. U každého vzorku byla proměřena koncentrace 2 krát a ta byla posléze vyředěna na 5 ng / μ l.

Z elektroforeogramu (obr. č. 45) je patrné, že fragmenty amplifikované DNA po PCR jsou rovnoměrně široké.

5. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu PCR – RFLP pro taxonomické zařazení kvasinek.

V teoretické části je popsána morfologie, cytologie kvasinek, jejich způsob rozmnožování a metabolismus. Velký důraz je kladen na taxonomii kvasinek a na její význam pro vědu a praxi. Podrobně je popsána amplifikace DNA *in vitro* pomocí polymerázové řetězové reakce, teplotní režim a doby trvání jednotlivých kroků při polymerázové řetězové reakci. Pozornost je věnována také komponentám reakční směsi.

Metodou PCR – RFLP byly identifikovány vzorky bílého vína, které nebylo možné zařadit v rámci prací z roku 2008 [42, 43, 44]. Bylo zjištěno, že některé vzorky nebyly dostatečně přečištěny, protože obsahovaly více než jednu kvasinku. Přečištění uskutečnili pracovníci sbírky kvasinek, umístěné na Chemickém ústavu SAV v Bratislavě a tyto izolované kvasinky byly taktéž identifikovány. Kvasinky označené čísly s apostrofem (př. 17'') jsou nově přečištěné. Typové kvasinkové kmény, které byly použity pro identifikaci našich kvasinek pocházejí ze sbírky kultur kvasinek z Chemického ústavu SAV v Bratislavě.

Amplifikovaná DNA vzorků vinných kvasinek a typových kvasinek primery ITS1 a ITS4 byla podrobena restriční analýze pomocí restričních endonukleáz: *HinfI*, *HaeIII*, *TaqI*, *HhaI*, *HpaII*, *MseI*, *AluI*. Porovnáním délek restričních fragmentů typových kvasinek ze sbírky kmenů kvasinek CCY z Chemického ústavu SAV v Bratislavě s délkami restričních fragmentů našich vzorků vinných kvasinek byly identifikovány kvasinkové kmény.

Shodně naštěpenou DNA měly kvasinky: 1" = 1, 4' = 4, 5' = 5, 14 = 14, 17" = 17, 19' a 19" = 19, 9 = 17', 21", 22', 31".

Vzorky vinných kvasinek 1, 1", 4, 4', 7, 8, 14, 15, 27" byly identifikovány jako *Pichia fermentans*, vzorky vinných kvasinek 2, 5, 5', 12 byly zařazeny do kmene *Pichia membranifaciens* a vzorky vinných kvasinek 17, 17", 19, 19', 19" 20 byly identifikovány jako *Rhodotorula glutinis*. Vzorek 16 byl zařazen do rodu *Rhodotorula* a nebyl blíže identifikován, neboť pro něj nebyla nalezena typová kvasinka. Vzorky vinných kvasinek 9, 17', 21", 22', 31" není možné zařadit, protože PCR produkt byl délky 500 bp a pouze jedna typová kvasinka (*Candida krusei*) měla stejnou délku po PCR. Nebyla nalezena shoda mezi touto typovou kvasinkou a vinnými kvasinkami po restriční analýze. Následující práce by se měla zaměřit na identifikaci těchto nezařazených kvasinek a rozšířit analýzy o typové kvasinky rodu *Candida*, eventuálně další, které se mohou ve víně vyskytovat.

Typové kvasinky a vzorky vinných kvasinek patřící do rodu *Rhodotorula* a *Pichia* byly zpracovány pomocí softwaru. Výsledné dendogramy typových kvasinek a vzorků vinných kvasinek byly zatíženy chybou, která má původ v definování fragmentů DNA po restriční analýze z několika gelů. K vyhodnocení byl tento software použit poprvé. Pro sestavení dendogramu byla použita metoda shlukové analýzy UPGMA a Jaccardův korelační koeficient podobnosti. Tolerance pozice fragmentů byla na úrovni 5 %. Je možné konstatovat, že typové kvasinky rodu *Rhodotorula* je touto metodou možné rozlišit až na úroveň kmene, což se nám nepodařilo u rodu *Pichia*. Typové kvasinky rodu *Pichia* jsme schopni identifikovat na úrovni druhu. U rodu *Candida* nebyla nalezena shoda po restriční analýze mezi typovou kvasinkou (*Candida krusei*) a vinnými kvasinkami 9, 17', 21", 22', 31". Pro zařazení těchto kvasinek je nutné analyzovat další typové kvasinky rodu *Candida*, aby bylo možné potvrdit nebo vyvrátit naši hypotézu, že do tohoto rodu opravdu patří. Z dendogramu je patrné, že se tato skupina (rod *Candida*) rozdělil na dvě skupiny. První skupina obsahuje

vzorky vinných kvasinek 17', 21'', 22', 31'', které jsou totožné. Druhá skupina obsahuje vzorek 9.

Z dendogramu vzorků vinných kvasinek 17, 17'', 19, 19', 19'' 20, které byly identifikovány jako *Rhodotorula glutinis* a vzorku 16, který byl zařazen do rodu *Rhodotorula*, je patrná velká odlišnost vzorku 16 od všech ostatních vzorků vinných kvasinek. Kvasinky 19' a 19'' jsou totožné na kmenové úrovni, kvasinka 19 se od nich liší. Kvasinka 17'' i 20 jsou totožné v rámci kmene a kvasinka 17 je odlišná.

Z dendogramu vzorků vinných kvasinek 1'', 4, 4', 7, 8, 14, 15, 27''', které byly identifikovány jako *Pichia fermentans* a vzorků vinných kvasinek 2, 5, 5', 12, které byly zařazeny do kmene *Pichia membranifaciens* je patrné, že kvasinky 5, 12 a 2 jsou totožné v rámci kmene a kvasinka 5' je odlišná od této skupiny. Další skupina se dělí na dvě skupiny kvasinek totožných na kmenové úrovni. Kvasinky 15, 8 a kvasinky 1, 7, 4 a 14. Kvasinky 1'', 4', 14* (přečištěný vzorek vinné kvasinky 14) a 27''' v rámci další skupiny jsou opět totožné na kmenové úrovni.

Optimalizace metody PCR – RFLP vycházela z úpravy reakčních podmínek PCR, aby výsledné gely bylo možné objektivně vyhodnotit. Optimalizace zahrnovala analýzu vlivu různých koncentrací Mg^{2+} na specifčnost PCR a úprava koncentrace DNA přidávané do reakční směsi pro PCR na 5 ng / μ l. Koncentrace 1,5 mM $MgCl_2$ a teplota annealingu (připojení) primerů 48°C se jeví jako optimální z hlediska výtěžnosti produktu a specifčnosti reakce. Dále je vhodné, aby na začátku do reakční směsi vstupovala DNA stejné koncentrace, abychom získali stejné množství amplikonu. Z výsledku je patrné, že analyzovaná amplifikovaná DNA všech vzorků, tj. ředěných i neředěných, je na gelu v optimální koncentraci.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Šilhánková, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha : Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [2] Veselá, M. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. 100 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [3] Kocková-Kratochvílová, A. *Taxonomia kvasinek a kvasinkových mikroorganismů*. 1. vyd. Bratislava : Alfa, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
- [4] Kocková-Kratochvílová, A. *Kvasinky a kvasinkové mikroorganismy*. 1. vyd. Bratislava : Alfa, 1982. 488 s.
- [5] Gorner, F., Valík, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [6] Vodrážka, Z. *Biochemie*. 2. opravené vyd. Praha : Academia, 1999. 3 díly. (170, 124, 182 s.). ISBN 80-200-0600-1.
- [7] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Walter, P., Roberts, K., Raff, M.: *Základy buněčné biologie*. 2.vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s.r.o. ISBN 80-902906-0-4.
- [8] *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. D. Vraná. 1. vyd. Praha : Academia, 1986. 376 s.
- [9] Klouda, P. *Základy biochemie*. 1. vyd. [s.l.] : Pavel Klouda, [2003?]. 155 s. ISBN 80-86369-00-5.
- [10] Hrstka, M.: *Obecná biologie*. 1. vyd. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2005. 112 s. ISBN 80-214-3057-5
- [11] Jelínek, J., Zicháček, V. a kol: *Biologie*. 4. vyd. Olomouc, 2000. 559 s. ISBN 80-7182-107-1
- [12] Čepička, J. a kol.: *Obecná potravinářská technologie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- [13] Hudecová, D., Majtán, V. *Mikrobiológia I*. 1. vyd. Bratislava : STU, 2002. 189 s. ISBN 80-227-1663-4.
- [14] Burdychová, R., Sládková, P. *Mikrobiologická analýza potravin*. 1. vyd. Brno : MZLU v Brně, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7375-116-6.
- [15] Bartoš, M., Bartošová, L. *Základy molekulární biologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno : 2007. 148 s. ISBN 978-80-7305-020-7.
- [16] Králová, B., Fukal, L., Rauch, P., Ruml, T.. *Bioanalytické metody*. 3. vyd. Praha : VŠCHT, 2007. 254 s. ISBN 978-807080-449-3.
- [17] Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J.: *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno : MU, 2005. 181 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [18] Knoll, A., Vykoukalová, Z. *Molekulární genetika zvířat : Metody detekce polymorfizmů DNA genů*. 1. vyd. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně : 2002. 168 s. ISBN 80-7157-616-6.
- [19] Ruml, T., Rumlová, M., Pačes, Václav. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha : VŠCHT, 2002. 270 s. ISBN 978-80-7080-499-5.
- [20] Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., Pialek, J. *Genetické metody v zoologii*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2004. 235 s. ISBN 80-246-0795-6.
- [21] Bezouška, K., a kol. *Molekulární biologie a genetika VIII*. J. Jonák. 1. vyd. Praha : Sedistra, 1998. 264 s. ISBN 80-902588-0-8.
- [22] Voet, D.: *Biochemistry*. 3rd.ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. 1 591 s. ISBN 0-471-39223-5.

- [23] Boekhout, T., Robert, V.: *Yeast in food*. Cambridge England: Woodhead publishing limited, 2003. ISBN 0-8493-1926-9.
- [24] Walker, G. M.: *Yeast Physiology and biotechnology*. Chichester John Wiley and Sons Ltd., 1998. 350 p. ISBN 0-471-96446-8.
- [25] Pastor, P., Zupan, J., Čadež, N.: *Validation of yeast identification by in silico RFLP*. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology. 2007, v.15, s. 266-279.
- [26] Leaw, S. N., Chang, H. CH., Sun, H. F.: *Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions*. Journal of clinical microbiology. 2006, p. 693-699.
- [27] Jeune, CH., Erny, C., Demuyter, C., Lollier, M.: *Evolution of the population of Saccharomyces cerevisiae from grape to wine in a spontaneous fermentation*. Food Microbiology. 2006, v. 23, p. 709 – 716.
- [28] Schofield, M.A., Rowe, M.S., Hammond, J.R.M.: *Differentiation of brewery yeast strains by DNA fingerprinting*. J. Inst. Brew. 1995, v. 101, p. 75 – 78.
- [29] Josepa, S., Guillamon, J.M., Cano, J.: *PCR differentiation of Saccharomyces cerevisiae from Saccharomyces bayanus/Saccharomyces pastorianus using specific primers*. FEMS Microbiological Letters. 2000, v. 193, p. 255 – 259.
- [30] Coakley, M., Ross, R.P., Donnelly, D.: *Application of the polymerase chain reaction to the rapid analysis of brewery yeast strains*. J.Inst. Brew. 1996, v. 102, p. 349 – 354.
- [31] Masneuf, I., Aigle, M., Dubourdieu, D.: *Development of a polymerase chain/restriction fragment length polymorphism method for Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces bayanus identification in enology*. FEMS Microbiol. Lett. 1996, v. 138, p. 239 – 244.
- [32] Smole Mozina, Dlačny, D., Deak, T., Raspor, P.: *Identification of Saccharomyces sensu stricto and Torulaspora yeast by PCR ribotyping*. Lett. Appl. Microbiol. 1997, v. 24, p. 311 – 315.
- [33] Heras-Vasquez, F.J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente-Jimenez, J.M., Rodriguez-Vico, F.: *Identification of yeast species from orange fruit and juice by FFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed apacers*. FEMS Yeast Research. 2003, v.3, p.3-9.
- [34] Ivannikova, Yu.V., Naumova, E.S., Martynenko, N.N., Naumov, G.I.: *Characterization of the genome of Saccharomyces yeasts from red berry wines*. Microbiology. 2007, v. 76, p. 194 – 204.
- [35] Antunovics, Z., Irinyi, Sipiczki, M.: *Combined application of methods to taxonomic identification of Saccharomyces strains in fermenting botrytized grape must*. Journal of Applied Microbiology. 2005, v. 98, p. 971 – 979.
- [36] Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, I.J.: *Yeast: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, London. 1990, p. 1002.
- [37] Deák, T.: *Simplified techniques for identifying foodborne yeast*. Int. J. Food Microbiol., v. 19, p. 15-26.
- [38] Nguyen, H.V., Gaillardin, C.: *Two subgroups within the Saccharomyces bayanus species evidenced by PCR amplification and restriction polymorfismus of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit*. System. Appl. Microbiol. 1997, v. 20, p. 286 – 294.
- [39] Marinangeli, P., Clementi, F., Ciani, M., Mannazzu, I.: *SED 1 polymorphism within the genus Saccharomyces*. FEMS Yeast Research. 2004, v. 5, 73 – 79.

- [40] Naumov, G.I., Naumova, E., Gaillardin, C.: *Genetic and karyotyping identification of wine Saccharomyces bayanus isolates in France and Italy*. Syst. Appl. Microbiol. 1993, v. 16, p. 274 – 279.
- [41] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. : *Molecular Cloning – a laboratory manual*. 2. vydání. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. ISBN 0-87969-309-6.
- [42] Zdeňková, M. : *Identifikace kvasinek rodu Saccharomyces během kvašení bílého vína*. Brno, 2008. 63 s. Diplomová práce na FCH VUT v Brně Ústavu potravinářské chemie a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová Ph.D.
- [43] Škodová, A. : *Identifikace kvasinek rodu Saccharomyces z listů, bobulí a moštu révy vinné*. Brno, 2008. 61 s. Diplomová práce na FCH VUT v Brně Ústavu potravinářské chemie a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová Ph.D.
- [44] Mašitová, L. : *Taxonomické řazení kvasinek rodu Saccharomyces cerevisiae z vybraných matric*. Brno, 2008. 64 s. Diplomová práce na FCH VUT v Brně Ústavu potravinářské chemie a biotechnologií. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová Ph.D.
- [45] Rolfs, A., Schuller, I., Finckh, U., Weber-Rolfs, I. : *PCR: Clinical Diagnostics and Research*. Springer – Verlag Berlin. 1992. ISBN 3-540-55440-8.
- [46] Schéma horizontální elektroforetické vany. Dostupné z:
www.bioweb.genezis.eu/index.php?cat=11&file=elfo

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	adenin
ADP	adenosindifosfát
AFLP	polymorfismus délek restričních fragmentů
ATP	adenosintrifosfát
C	cytosin
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
dATP	deoxyadenintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dGTP	deoxyguanintrifosfát
dNTP mix	směs čtyř deoxyribonukleotidtrifosfátů
DP	diplomová práce
G	guanin
G-3-P	glyceraldehyd-3-fosfát
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nukleosidpolyfosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
pH	záporný logaritmus H_3O^+
Pi	anorganický monofosfát
RAPD	náhodně amplifiková polymorfní DNA
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
SAV	Slovenské akademie věd
T	thyamin
Taq DNA polymeráza	termostabilní DNA polymeráza
TBE	tris-borátový pufr
TDP	thiamindifosfát
<i>Rh.</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>P.</i>	<i>Pichia</i>

SEZNAM PŘÍLOH

Seznam typových kvasinek a délek fragmentů po PCR.

Vyhodnocení restrikční analýzy u typových kvasinek pomocí enzymů *HaeIII*, *HhaI*, *TaqI*.

Vyhodnocení restrikční analýzy u typových kvasinek pomocí enzymů *HinfI*, *HpaII*.

Vyhodnocení restrikční analýzy u typových kvasinek pomocí enzymů *AclI*, *MseI*.

PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Seznam typových kvasinek a délek fragmentů po PCR

Číslo vzorku	Sbírkové označení CCY	Kvasinky	Délka fragmentů po PCR (bp)
s1	20-2-22	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s2	20-2-28	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s3	20-2-31	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s4	No. 18	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s5	20-2-34	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s6	No. 269	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s7	No. 92	<i>Pichia membranifaciens</i>	450
s8	21-3-1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	900
s9	21-4-13	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s10	21-4-77	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s11	21-4-81	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s12	No. 109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s13	No. 242	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s14	No. 250	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s15	25-1-1	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	750
s16	46-3-15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s17	25-6-22	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s18	46-3-4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s19	46-3-13	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s20	No. 97	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s21	No. 124	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s23	No. 292	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s24	21-11-4	<i>Saccharomyces mangini</i>	880
s25	39-4-2	<i>Pichia fermentans</i>	450
s26	46-3-3	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s27	62-2-4	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	650
s28	25-6-12	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	450
s29	25-6-1	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s30	19-9-2	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	620
s31	20-2-24	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s32	20-1-32	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	650
s33	39-4-1	<i>Pichia fermentans</i>	450
s34	38-5-6	<i>Pichia subpelliculosa</i>	650
s35	25-6-12	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	450
s36	46-3-2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750
s37	38-5-1	<i>Pichia subpelliculosa</i>	650
s38	19-5-1	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	620
s39	25-8-5	<i>Hanseniaspora vineae</i>	750

s40	25-9-4	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	750
s41	19-6-16	<i>Sporidiobolus roseus</i>	650
s42	20-11-22	<i>Rhodotorula minuta</i>	650
s43	20-14-7	<i>Rhodotorula graminis</i>	650
s44	39-23-5	<i>Pichia guilliermondii</i>	600
s45	109	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s46	235	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s47	242	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s48	244	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s49	250	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s50	18	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s51	227	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s52	253	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s53	292	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s54	20-2-34	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s55	20-1-35	<i>Rhodotorula glutinis</i>	650
s56	21-4-96	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880
s57	29-9-32	<i>Candida krusei</i>	500
s58	21-46-1	<i>Saccharomyces aceti</i>	880
s59	21-21-43	<i>Saccharomyces oviformis</i>	880
s60	21-11-1	<i>Saccharomyces chevalieri</i>	880
s61	21-12-3	<i>Saccharomyces steineri</i>	880
s62	21-6-6	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	880
s63	21-13-1	<i>Saccharomyces bayanus</i>	880

Příloha č. 2: Vyhodnocení restrikční analýzy u typových kvasinek pomocí enzymů *HaeIII*, *HhaI*, *TaqI*

Číslo vzorku	HaeIII	HhaI	Taq
s1	n	300+220+100	340+220
s2	400+220	300+220+100	340+220
s3	400+220	300+220+100	340+220
s4	n	300+220+100	340+220
s5	n	300+220+100	340+220
s6	n	300+220+100	340+220
s7	300+80+60	220+100+80	200+160+50
s8	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s9	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s10	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s11	310+240+170+130	220+180+80+60	300+280+140+100+60
s12	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s13	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s14	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s15	n	650+100	400+240
s16	n	320+100	400+180+150
s17	n	320+100	400+180+150
s18	n	320+100	400+180+150
s19	n	320+100	400+180+150
s20	n	320+100	400+180+150
s21	n	320+100	400+180+150
s23	n	300+220+100	340+220
s24	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s25	350+80	180+100+80	360+200
s26	n	320+100	400+180+150
s27	420+220	300+220+100	220+180
s28	380+70	170+120+80	160+140+120
s29	n	300+180+100+60	400+180+150
s30	420+130+80	300+220+100	360+220
s31	420+220	320+300	240+180+140+120
s32	420+220	300+220+100	240+180+140+120
s33	350+80	180+100+80	200+160+50
s34	n	280+60	320+200
s35	380+70	170+120+80	160+140+120
s36	n	320+100	400+180+150
s37	n	280+60	320+200
s38	420+130+80	400+220	340+200
s39	450+120+100+80	280+150	410+340
s40	n	320+100	300+170+140
s42	400+220	300+220	220+180
s43	400+220	300+220	370+240
s44	400+120+80	300+260	250+180+160

s45	310+240+170+130	380+350+140	280+260+140+100+60
s46	310+240+170+130	380+350+140	280+260+140+100+60
s47	310+240+170+130	380+350+140	280+260+140+100+60
s48	310+240+170+130	380+350+140	280+260+140+100+60
s49	310+240+170+130	380+350+140	280+260+140+100+60
s50	n	300+240+110	380+240
s51	n	300+240+110	380+240
s52	450+240	300+240+110	240+180
s53	n	300+240+110	240+180
s54	n	300+240+110	380+240
s55	450+240	300+240+110	380+240
s56	310+240+170+130	380+350+140	280+260+140+100+60
s57	400+100	220+180	300+120
s58	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s59	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s60	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s61	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s62	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60
s63	310+240+170+130	380+350+140	300+280+140+100+60

Příloha č. 3: Vyhodnocení restrikční analýzy u typových kvasinek pomocí enzymů *HinfI*, *HpaII*

Číslo vzorku	HinfI	HpaII
s1	220+120	n
s2	220+140+80	550
s3	220+140+80	550
s4	220+140+80	500+120
s5	220+120	n
s6	220+120	300
s7	250+200	240+150
s8	350+120	700+120
s9	350+120	700+120
s10	350+120	700+120
s11	350+120	700+120
s12	350+120	700+120
s13	350+120	700+120
s14	350+120	700+120
s15	240+220+180+120	n
s16	350+200+160+70	n
s17	350+200+160+70	n
s18	350+200+160+70	n
s19	350+200+160+70	n
s20	350+200+160+70	n

s21	350+200+160+70	n
s23	220+120+80	n
s24	350+120	700+120
s25	250+200	240+150
s26	350+200+160+70	n
s27	150+120+80+60	500+120
s28	250+200	n
s29	350+200+160+70	n
s30	300+180+220+120+80	300
s31	280+240+100	500+120
s32	250+220+70	500+120
s33	250+200	240+150
s34	310+200+140	n
s35	250+200	n
s36	350+200+160+70	n
s37	320+300+180+120	n
s38	280+240+100	300
s39	380	n
s40	350+200+160+70	n
s42	350+220	520
s43	350+220+120+100	n
s44	310+290	380+160
s45	400+130	700+120
s46	400+130	700+120
s47	400+130	700+120
s48	400+130	700+120
s49	400+130	700+120
s50	280+140+100	500+120
s51	280+140+100	n
s52	260+240	n
s53	240+140+100	n
s54	240+140+100	n
s55	380+240	550+100
s56	280+140	700+120
s57	220+180+150	280
s58	380+120	700+120
s59	380+120	700+120
s60	380+120	700+120
s61	380+120	700+120
s62	380+120	700+120
s63	380+120	700+120

Příloha č. 4: Vyhodnocení restriční analýzy u typových kvasinek pomocí enzymů *AluI*, *MseI*

Číslo vzorku	AluI	MseI
s1		450
s2	300+110+90	200+160+120
s3	300+110+90	480
s4	300+110+90	480+90+60
s5	300+110+90	400+70+50
s6	300+110+90	400+70+50
s7	320+90+60	180+100+50
s8	800+80	220+180+120+100+90
s9	800+80	220+180+120+100+90
s10	800+80	220+180+120+100+90
s11	800+80	220+180+120+100+90
s12	800+80	220+180+120+100+90
s13	800+80	220+180+120+100+90
s14	800+80	220+180+120+100+90
s15	300+280+190	280+160+80+50
s16	550+180	280+140+100+80
s17	550+180	280+140+100+90
s18	550+180	300+140+100
s19	550+180	300+140+100
s20	550+180	300+140+100
s21	550+180	300+140+100
s23	300+110+90	400+70+50
s24	800+80	240+200+140+100
s25	290	n
s26	550+180	250+120+90+80+50
s27	300+110+90	480
s28	400+60	350+300+120
s29	520+180	250+120+90+80+50
s30	300+110+90	480+90+60
s31	200+120+90	220+180+120
s32	200+120+90	220+180+120
s33	290	n
s34	n	240+140+120
s35	400+60	320+280
s36	520+180	250+120+90+80+50
s37	n	240+140+120
s38	300+120+90	480+90+60
s39	700	220+200+70
s40	500+150	260+120
s42	400+120+90	220+180+120

s43	300+120+90	450
s44	n	400+100
s45	800+80	220+180+120+100+90
s46	800+80	220+180+120+100+90
s47	800+80	220+180+120+100+90
s48	800+80	220+180+120+100+90
s49	800+80	220+180+120+100+90
s50	300+120+90	500
s51	300+120+90	450
s52	450+120	200+160+110
s53	300+120+90	450
s54	300+120+90	450
s55	450+120	200+160+110
s56	800+80	220+180+120+100+90
s57	350	n
s58	800+80	220+180+120+100+90
s59	800+80	220+180+120+100+90
s60	800+80	220+180+120+100+90
s61	800+80	220+180+120+100+90
s62	800+80	220+180+120+100+90
s63	800+80	220+180+120+100+90