

**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**IDENTIFIKACE KVASINEK Z INTERSPECIFICKÉ  
ODRŮDY VINNÉ RÉVY**

IDENTIFICATION OF YEASTS FROM INTERSPECIFIC VARIETIES OF GRAPES

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Peter Sadel**

BRNO 2016





# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## IDENTIFIKACE KVASINEK Z INTERSPECIFICKÉ ODRŮDY VINNÉ RÉVY

IDENTIFICATION OF YEASTS FROM INTERSPECIFIC VARIETIES OF GRAPES

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. Peter Sadel

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

BRNO 2016



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0913/2014** Akademický rok: **2015/2016**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bc. Peter Sadel**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí práce: **Mgr. Dana Vránová, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název diplomové práce:

Identifikace kvasinek z interspecifické odrůdy vinné révy

### Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na zadané téma
2. Výběr a testování vhodné metody pro identifikaci
3. Zhodnocení získaných výsledků z experimentální části práce a jejich diskuse

### Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

-----  
Bc. Peter Sadel  
Student(ka)

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

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Cieľom diplomovej práce bolo identifikovať a charakterizovať kvasinky z muštu odrody Hibernal a tiež zbierkové kvasinky využitím metódy RFLP-PCR.

Diplomová práca začala teóriou, ktorá sa zaoberala vínom, kvasinkami a použitím metód molekulárnej biológie. Na teóriu nadväzovala experimentálna časť, ktorá bola rozdelená na dve oblasti.

Prvá časť experimentálnej práce mala za úlohu charakterizovať a identifikovať kvasinky z muštu odrody Hibernal pomocou metódy PCR a následne RFLP-PCR. Vo vzorkách muštu bola dokázaná prítomnosť kvasiniek rodu *Saccharomyces* a *Pichia*.

Úlohou druhej experimentálnej časti diplomovej práce bolo rozšíriť databázu o zbierkové kvasinky za použitia rovnakých postupov a metód ako v prvej experimentálnej časti.

## **ABSTRACT**

The main goal of my diploma thesis was to identify and characterize yeasts from must Hibernal and also collection yeasts by using methods called RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction).

Theory was the first part of my diploma thesis which dealt with wine, yeasts and molecular methods. Theory section was followed by experimental section divided into two parts.

The main goal of the first part was to characterize and identify yeasts from must Hibernal by using PCR and RFLP-PCR methods. In the samples there were found yeasts *Saccharomyces* and *Pichia*.

The second experimental part of my diploma thesis had a goal to extend the database of new yeasts using the same methods mentioned in the first part of experimental section.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Víno, mušt, kvasinky, identifikácia, charakterizácia, PCR, RFLP-PCR.

## **KEY WORDS**

Wine, must, yeasts, identification, characterization, PCR, RFLP-PCR.

SADEL, P. *Identifikace kvasinek z interspecifické odrůdy vinné révy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 60 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D..

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a všetky použité literárne zdroje správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

Chcel by som sa poďakovať za venovaný čas, odborné konzultácie, cenné rady a pripomienky pri vypracovaní diplomovej práce Mgr. Dane Vránovej, Ph.D..

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>RÉVA VINNÁ</b>	<b>9</b>
2.1.1	Pestovanie révy vinnej	9
2.1.2	Chemické zloženie hrozna	9
2.1.3	Morfológia hrozna	9
2.1.4	Biele víno	10
2.1.5	Červené víno	11
2.1.6	Zrenie hrozna	12
2.1.7	Alkoholové kvasenie a mikrobiológia vína	12
2.1.8	Zrenie vína	15
2.1.9	Ošetrovanie vína	15
<b>2.2</b>	<b>KVASINKY</b>	<b>15</b>
2.2.1	Cytológia kvasiniek	16
2.2.1.1	Bunková stena	16
2.2.1.2	Cytoplazmatická membrána	17
2.2.1.3	Cytoplazma	17
2.2.1.4	Endoplazmatické retikulum	18
2.2.1.5	Mitochondrie	18
2.2.1.6	Vakuola	18
2.2.1.7	Golgiho aparát	18
2.2.1.8	Cytoskelet	18
2.2.1.9	Jadro	18
2.2.2	Rozmnožovanie kvasiniek	19
2.2.2.1	Vegetatívne rozmnožovanie	19
2.2.2.2	Pohlavné rozmnožovanie	20
2.2.3	Chemické zloženie bunkovej hmoty kvasiniek	20
2.2.4	Výskyt kvasiniek a ich význam	20
2.2.5	Požiadavky na výživu pre kvasinky	21
<b>2.3</b>	<b>METÓDY MOLEKULÁRNEJ BIOLÓGIE</b>	<b>21</b>
2.3.1	Polymerázová reťazová reakcia	21
2.3.1.1	Komponenty pre PCR	23
2.3.1.2	DNA polymeráza	24
2.3.1.3	Priméry pre PCR	24
2.3.2	Restričné endonukleázy	24
2.3.3	PCR-RFLP	24
2.3.4	Elektroforéza	25
2.3.5	Agarózová gélová elektroforéza	25
2.3.6	Vizualizácia elektroforetických gélov	26
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b>	<b>28</b>
3.1	Mikroorganizmy	28

3.2	Chemikálie	28
3.3	Prístroje a pomôcky	28
3.4	Kultivačné média a použité roztoky	29
3.4.1	Príprava kultivačného média	29
3.4.2	Príprava kultivačného média s antibiotikom a kyselinou propiónovou	29
3.4.3	Príprava 10x TBE pufru	29
3.4.4	Príprava 1x TBE pufru	30
3.4.5	Príprava 1x TBE pufru s etídiom bromidom	30
3.4.6	Príprava etídiom bromidu	30
3.4.7	Príprava 2 % agarózového gélu	30
3.4.8	Príprava dĺžkového štandardu 100 bp	30
3.4.9	Príprava octanového pufru ( $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ )	30
3.4.10	Príprava 80 % etanolu	30
3.4.11	Príprava PCR zmesi	31
3.5	Pracovný postup	31
3.5.1	Izolácia čistých kultúr kvasiniek	31
3.5.2	Kochova zried'ovacia metóda	31
3.5.3	Izolácia DNA	32
3.5.4	PCR	32
3.5.5	Prečistenie PCR produktu	33
3.5.6	Restrikčná analýza	33
3.5.7	Elektroforetická detekcia PCR produktov a restrikčných fragmentov	33
3.5.8	Spracovanie výsledkov pomocou programu BioNumerics	34
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA</b>	<b>35</b>
4.1	Identifikácia kvasiniek izolovaných z muštu	35
4.1.1	Kultivácia kvasiniek	35
4.1.2	Izolácia DNA	35
4.1.3	Amplifikácia izolovanej DNA (pomocou PCR)	35
4.1.4	Restrikčná analýza	37
4.1.5	Restrikčná endonukleáza <i>HaeIII</i>	37
4.1.6	Restrikčná endonukleáza <i>HhaI</i>	38
4.1.7	Restrikčná endonukleáza <i>HinfI</i>	40
4.1.8	Restrikčná endonukleáza <i>TaqI</i> <sup>a</sup>	41
4.1.9	Dendrogram kvasiniek izolovaných z vína	43
4.2	Identifikácia zbierkových kvasiniek	46
4.2.1	Kultivácia zbierkových kvasiniek	46
4.2.2	Izolácia DNA	46
4.2.3	Amplifikácia izolovanej DNA	46
4.2.4	Restrikčná analýza	47
4.2.5	Restrikčná endonukleáza <i>HaeIII</i>	47
4.2.6	Restrikčná endonukleáza <i>HhaI</i>	48
4.2.7	Restrikčná endonukleáza <i>HinfI</i>	50
4.2.8	Restrikčná endonukleáza <i>TaqI</i> <sup>a</sup>	51

4.2.9	Dendrogram zbierkových kvasiniek	52
<b>5</b>	<b>ZÁVER</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY K OBRÁZKOM</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV</b>	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>PRÍLOHY</b>	<b>60</b>

# 1 ÚVOD

Vinohradníctvo a vinárstvo sprevádzajú ľudskú civilizáciu už od nepamäti. Víno patrí medzi najdlhšie známe alkoholické nápoje. Jeho výrobou sa zaoberali už obyvatelia Mezopotámie, starého Egypta, Babylonu Grécka i Ríma. Prvé zmienky o pestovaní révy vinnej na našom území sú podľa geologických nálezov z 11. storočia. [1,2]

Čo sa týka chemického zloženia hrozna, hlavnými zložkami sú voda, cukry, kyseliny, triesloviny, fenolové zložky, minerálne látky, dusíkaté látky a vitamíny. A práve spomínané cukry sú spolu s kvasinkami základom biochemického procesu nazývaného alkoholové kvasenie. Za alkoholové kvasenie muštu sú v hlavnej miere zodpovedné kvasinky rodu *Saccharomyces*.

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotné organizmy, ktoré patria medzi huby. Názov kvasinky dostali pre schopnosť väčšiny druhov skvasiť monosacharidy i niektoré disacharidy a trisacharidy na etanol a oxid uhličitý. Výskyt kvasiniek v prírode je široký, nachádzajú sa vo vode, pôde, atmosfére i v tráviacom trakte. Vzhľadom ku svojim sacharolytickým schopnostiam ich nájdeme najmä na substrátoch obsahujúcich sacharidy.

V posledných desaťročiach boli klasické metódy identifikácie kvasiniek založené na sledovaní ich fyziologických a morfológických vlastností nahradené modernými metódami molekulárnej biológie, ktoré sú založené na PCR.

Úlohou diplomovej práce bolo identifikovať a charakterizovať kvasinky. Na danú úlohu bola použitá metóda PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfizmus dĺžok restričných fragmentov). Podstata metódy PCR-RFLP spočíva v prvotnom namnožení dostatočného množstva PCR produktu a následnom využití restričných endonukleáz, ktoré štiepia polynukleotidový reťazec prerušením fosfodiesterovej väzby v určitých špecifických sekvenciách. Získané fragmenty, ktorých veľkosť a počet závisí od prítomnosti štiepneho miesta sa detegovali elektroforézou a následne vyhodnotili v programe BioNumerics.

## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Réva vinná

Réva vinná (lat. *Vitis vinifera*) je jednou z najdlhšie pestovaných rastlín a jej plody ľudia už po storočia využívajú buď na priamu konzumáciu alebo výrobu štiav, či vína. Rozmach pestovania je historicky spojený najmä s oblasťou Stredozemného mora. Réva vinná patrí medzi rastliny, ktoré majú rady teplé a dostatočne slnečné oblasti. [2, 3]

#### 2.1.1 Pestovanie révy vinnej

Pri výbere miesta pre pestovanie révy vinnej je dôležité zohľadniť klimatické faktory, topografické faktory a pôdne podmienky.

Medzi klimatické faktory zaraďujeme teplotu, slnečné žiarenie, zrážky i prúdenie vetra. Révu vinnú je možné pestovať v oblastiach mierneho pásma až po oblasti tropické. Oblasti mierneho pásma sú pre dozrievanie hrozna výhodné kolísaním dennej a nočnej teploty, čo má za následok docielenie harmónie medzi cukrom a kyselinami. Pozitívne je ovplyvnený i obsah aromatických látok v bobuliach.

Priemerná ročná teplota by pri pestovaní révy vinnej mala byť medzi 11 až 16 °C. Priemerná teplota počas vegetačného obdobia (1.4. až 31.10.) by mala dosahovať minimálne 16,5 °C. Dĺžka vegetačného obdobia by mala byť od 170 do 190 dní. Trvanie slnečného svitu by malo predstavovať minimálne 1100 až 1600 hodín za vegetačné obdobie. Celkový úhrn zrážok by sa mal pohybovať medzi 500 až 600 mm.

Medzi topografické faktory patrí nadmorská výška, expozícia oblasti k svetovým stranám, sklon pozemku a prúdenie chladných vetrov.

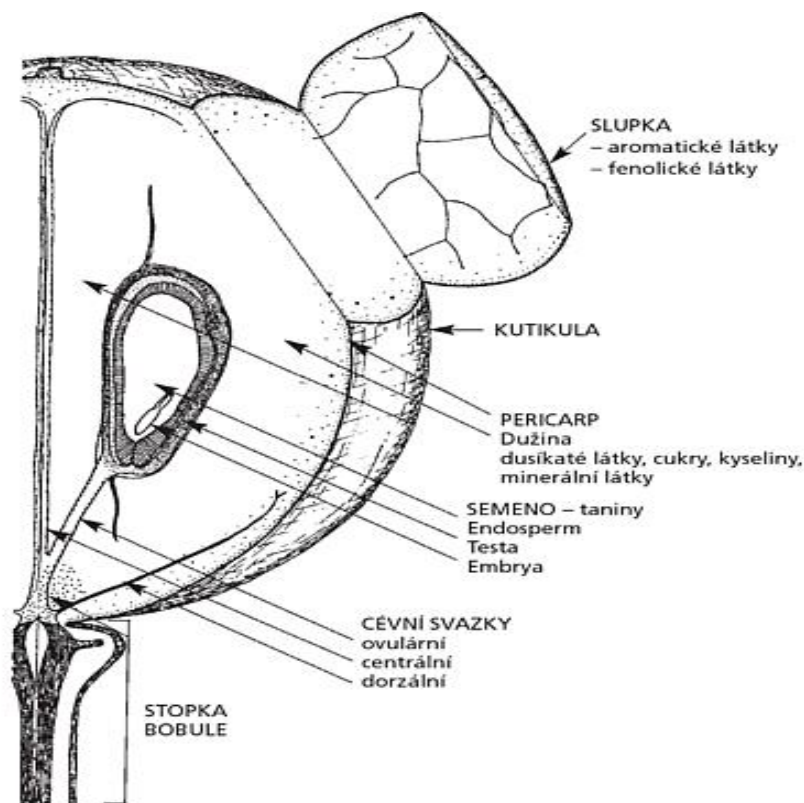
Medzi pôdne podmienky patrí geologické podložie vo vzťahu k obsahu vápnika v pôde, pôdny druh, či hospodárenie pôdy s vodou. [3]

#### 2.1.2 Chemické zloženie hrozna

Chemické zloženie hrozna (obr. č. 1) je rozmanité a premenlivé v závislosti od odrody, pôdnych a klimatických podmienok, dátumu zberu. Obsah vody je závislý na množstve a termíne zrážok, prípadne používanej závlahy. Cukry sú zastúpené glukózou a fruktózou, sacharóza sa nachádza v hrozne iba v minimálnom množstve. Organické kyseliny sú zastúpené hlavne kyselinou vínnou a kyselinou jablčnou. Významnou skupinou látok hrozna sú minerálne látky. V hrozne sú dôležité hlavne kationy draslíka, vápnika, horčíka a sodíka. V hrozne sú taktiež prítomné vitamíny, bielkoviny, fenolické látky a farbivá. [3]

#### 2.1.3 Morfológia hrozna

Hrozno (obr. č. 1) sa skladá z bobúľ a stopiek (strapín). Bobuľa pozostáva z dužiny, šupky a semien. Dužina predstavuje až 90 % hmotnosti hrozna a obsahuje hlavne jednoduché cukry (glukózu, fruktózu), kyseliny (vínnu a jablčnú), dusíkaté a minerálne látky. Po vylisovaní sa z dužiny získava mušt. Najcennejšími zložkami šupiek sú farbivá a aromatické látky. Semená obsahujú triesloviny a oleje. Nevyzreté stopky dávajú vínu nepríjemnú horkú chuť. [4]



**Obr. č. 1:** Bobuľa révy vinnej a rozloženie dôležitých obsahových látok [3]

#### 2.1.4 Biele víno

Prvým krokom pri výrobe bieleho vína je doprava hrozna. Po dopravení hrozna dochádza k mletiu a odstopkovaniu, čiže oddeleniu bobúľ od stopiek (obr. č. 2). Odstopkovanie zaručí, že sa do muštu nedostanú látky, ktoré by mohli zhoršiť sensorickú kvalitu konečného produktu (najmä triesloviny). Mletie hrozna je dej (obr. č. 3), pri ktorom sa rozdrvia bobule a prevzdušní mláto (mláto je pojem pre pomleté hrozno). Mlynčeky sú zhotovené tak, aby sa bobule dostatočne rozomleli a aby nedošlo k porušeniu semien. Mlecie zariadenie je doplnené dopravníkmi a čerpadlami mláta, ktoré ho premiestnia do lisov, kde dôjde k zisku najkvalitnejšieho podielu muštu – samotoku.

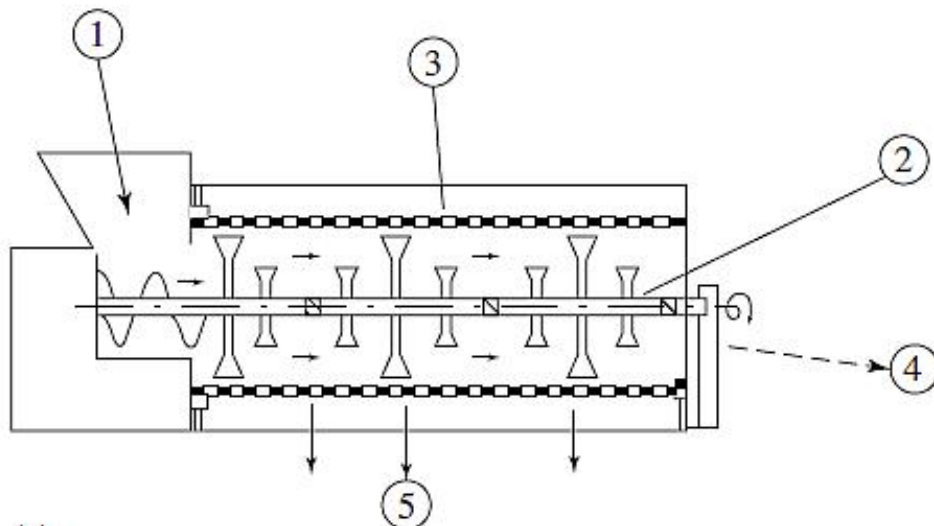
Pri aromatických odrodách nasleduje nakvášanie mláta, pri ktorom zriedený roztok vzniknutého alkoholu extrahuje aromatické látky hrozna. Pri bielych odrodách trvá nakvášanie iba 12 až 24 hodín, aby nedošlo k extrakcii neželaných látok (triesloviny, chlorofyl). Na zabránenie oxidácie a ako konzervačný prostriedok sa môže pridávať oxid siričitý.

Ďalšou povolenou úpravou muštu je jeho dosladenie. Pri dosladení sa pridáva sacharóza, alebo zahustený mušt. Povolené úpravy muštu sa vždy riadia príslušnou legislatívou.

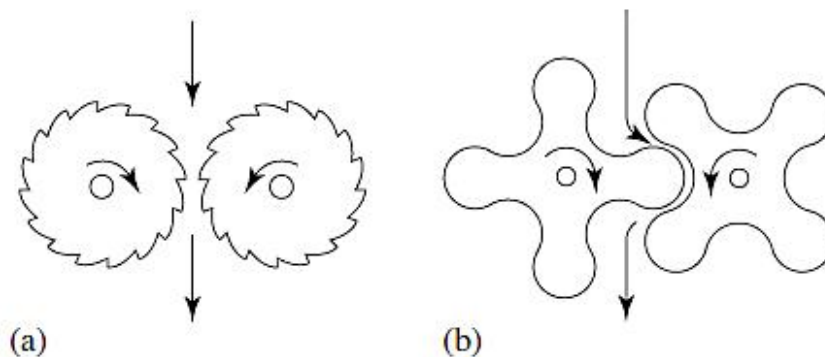
[4, 5, 6, 7]

Kvasenie začína buď samovoľne (spontánne) činnosťou kvasiniek obsiahnutých už v mušte, alebo sa mušt zakvasí čistou kultúrou vyšľachtených kvasiniek. Tie zaistia rýchle rozkvasenie muštu, dokonalejšie prekvasenie cukru v mušte a tiež čistejšie kvasenie, lebo rýchlejšia tvorba etanolu zabraňuje rozmnožovaniu nežiaducich mikroorganizmov.

Medzi optimálne podmienky pre priebeh kvasenia patrí dostatočná koncentrácia a dobrý zdravotný stav kvasiniek, teplota od 13 do 18 °C, potrebný obsah kyslíka pre rozmnožovanie kvasiniek, potrebná koncentrácia cukru a kyslejšie prostredie. [5]



**Obr. č. 2:** Schéma zariadenia na odstopkovanie hrozna. 1 – násypka, 2 – hriadeľ s lopatkami a ramenom, 3 – valec, 4 – smer vypadávanía stopiek, 5 – odstopkované bobule. [8]



**Obr. č. 3:** Tvary mlecieho zariadenia. (a) – špirálovito-vrúbkovaný, (b) – drážkovaný, kde oba profily sú vzájomne prepojené. [8]

### 2.1.5 Červené víno

Červené vína sa svojím charakterom a chuťovými vlastnosťami výrazne líšia od bielych vín. Majú sýtočervenú farbu, vyšší obsah alkoholu, menšiu koncentráciu kyselín a primeranú trpkosť.

Prevažná časť červeného farbiva v hrozne sa vytvára počas zrenia hrozna, preto sa odporúča oberať hrozno v čase optimálnej zrelosti. Červené farbivo je uložené v šupkách hrozna, vo vakuolách buniek. Mechanickým spôsobom, mletím a lisovaním sa farbivo dostatočne neuvoľní, lebo je uzavreté bunkou. Bunka sa ale môže usmrtiť alkoholom,

poprípade pôsobením tepla, preto sa pomleté hrozno pred lisovaním nakvása, alkoholizuje pridaním starého vína, alebo sa ovplyvňuje teplom.

Modré odrody hrozna sa spracovávajú odzrňovaním a mletím. Získané mláto sa nakvása 10 až 14 dní pri teplote 20 °C. Keď začne mláto kvasiť, tuhé častice sa nadnášajú a vytvoria na povrchu muštu mlátový klobúk, ktorý treba udržať ponorený v mušte, aby sa zabránilo jeho styku so vzduchom. Prekvasené mláto sa vylisuje a mušť ďalej dokvása rovnakým spôsobom, ako tomu je pri kvasení bielych muštov. [4]

Pri výrobe červených vín sa používa i kvasenie cez štyri. Pri danom spôsobe sa na začiatku kvasenia mláta pridá toľko červeného vína, aby sa obsah alkoholu v mláte zvýšil nad 4 objemové percentá. Zvýšeným obsahom alkoholu sa už na začiatku kvasenia urýchlí uvoľňovanie červeného farbiva a potlačí sa rozvoj nežiaducich mikroorganizmov. [5]

### **2.1.6 Zrenie hrozna**

Základným pochodom pri zrení hrozna je postupná syntéza zlúčenín ako celulóza, protopektíny, cukry, triesloviny i tvorba farebných chuťových a aromatických látok (polyfenolov) v hrozne.

Samotné polyfenoly sa delia niekoľkých skupín. Prvou skupinou sú fenolkarboxylové kyseliny a ich deriváty (kyselina benzoová, kyselina škoricová). Druhou skupinou fenolických látok sú antokyaniny, pigmenty prítomné hlavne v šupke. Medzi fenolické zlúčeniny patria tiež taníny, ktoré sa vyskytujú v šupke a semene hrozna.

Všetky pochody pri zrení hrozna prebiehajú za účasti molekulárneho kyslíka a sú aktivované enzýmami špecifickými pre jednotlivé biochemické reakcie. Popri syntéze prebieha okrem dýchacích procesov i odbúravanie vytvorených látok na látky jednoduchšie. Oxidáciou cukrov vzniká napríklad kyselina vínna a kyselina jablčná. Celulóza, protopektíny a bielkovinové látky sa rozpadávajú na zložky s nižšou molekulovou hmotnosťou a všetky tieto látky, spolu i s minerálmi získanými z pôdy, medzi sebou reagujú a tvoria nové zlúčeniny. [5]

### **2.1.7 Alkoholové kvasenie a mikrobiológia vína**

Alkoholové kvasenie je biochemický proces realizovaný kvasinkami a dochádza pri ňom k rozkladu cukru – glukózy a fruktózy, ktoré sa nachádzajú v hrozne, na etanol a oxid uhličitý. Daná reakcia však v sebe skrýva zložité reakcie, pri ktorých okrem alkoholov vzniká veľké množstvo vedľajších senzoricke významných produktov kvasenia.

Vedľajšie produkty alkoholového kvasenia delíme na primárne a sekundárne. Primárne vedľajšie produkty alkoholového kvasenia sú glycerol, kyselina mliečna, kyselina octová, kyselina jantárová a kyselina citrónová. Sekundárne vedľajšie produkty sú acetón, diacetyl, vyššie alkoholy, estery, aldehydy, ketóny a aromatické látky.

Alkoholové kvasenie začína glykolózou, ktorá je nasledovaná dekarboxyláciou pyruvátu na acetaldehyd a ten je redukovaný na etanol (obr. č. 4).

Počas glykolózy dochádza k premene hexóz na pyruvát. K reakciám glykolózy patrí postupná fosforylácia hexóz cez fruktózu-1,6-bisfosfát, ktorá sa následne štiepi na dva triosafosfáty a tie sa oxidujú na 1,3-bisfosfoglycerát. Táto oxidácia je pri niektorých mikroorganizmoch jediným zdrojom energie glykolózy. Časť takto získanej energie sa ihneď uloží vo forme ATP, ďalšia časť sa uvoľní po nasledujúcich reakčných stupňoch (pri premene

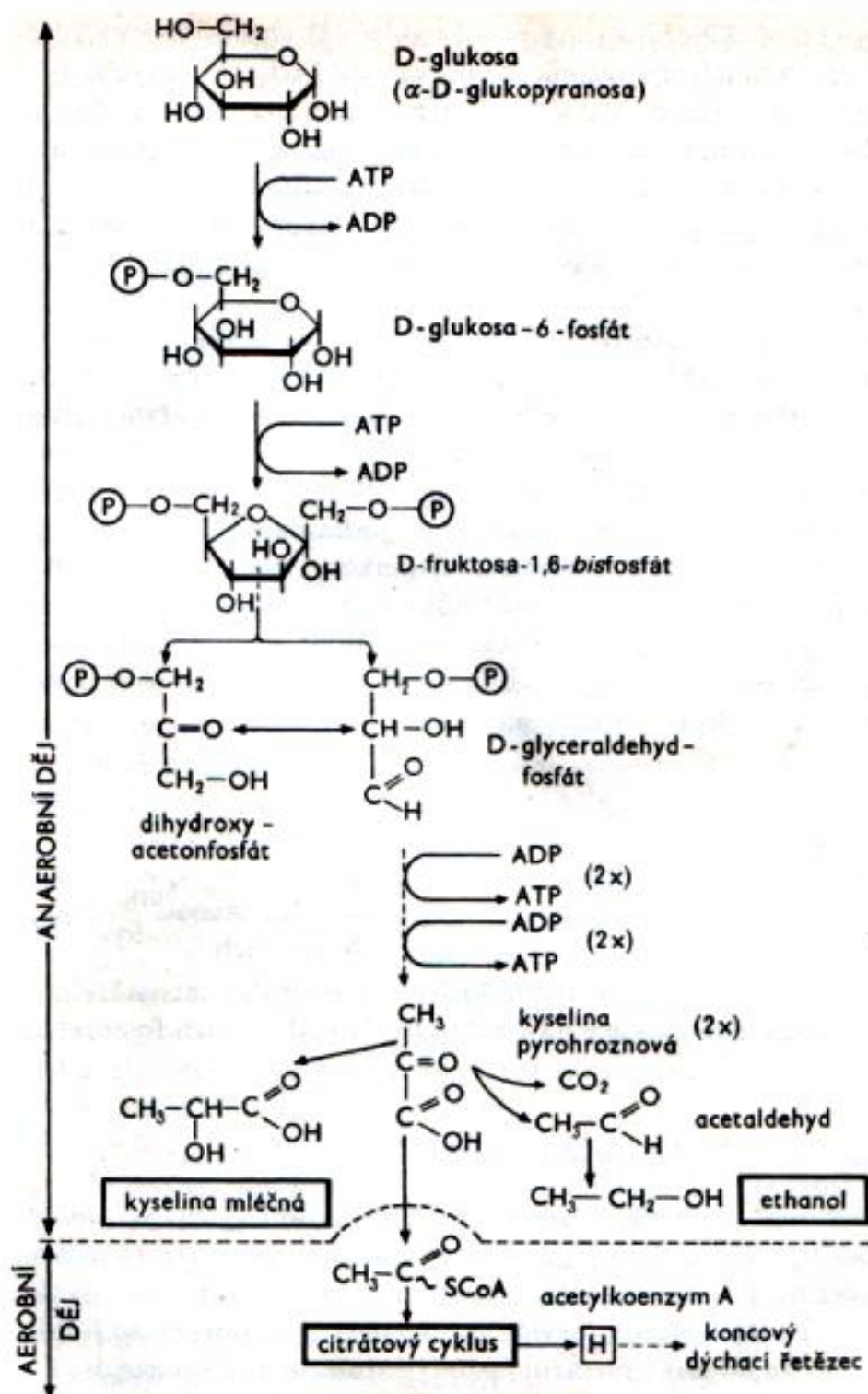
makroergickej zlúčeniny fosfoenolpyruvátu na pyruvát za vzniku ďalšej ATP). Zisk pri odbúraní jednej molekuly hexózy je 2 ATP.

Pri kvasinkách je pyruvát najskôr dekarboxylovaný na acetaldehyd a ten je pomocou redukovaného kofaktoru NADH a príslušného enzýmu redukovaný na etanol. Tým vznikajú z 1 molekuly hexózy 2 molekuly etanolu a 2 molekuly oxidu uhličitého za súčasného zisku 2 molekúl ATP. [2, 5, 9, 10]

Okrem kvasiniek sú v kvasiacom sa mušte prítomné i baktérie mliečneho kvasenia, ktoré sú dôležité pre takzvané biologické odbúravanie kyselín. Premenou kyseliny jablčnej na kyselinu mliečnu sa znižuje kyslosť vína a zjemňuje jeho chuť.

Vo víne môže prebiehať aj aeróbna oxidácia etanolu vplyvom octových baktérií, pri ktorej sa etanol mení na kyselinu octovú.

Počas kvasenia dochádza v dôsledku autolýzy kvasiniek k ďalším zmenám v chemickom zložení vína. Bielkovinové látky sa rozkladajú na nízkomolekulárne bielkoviny a aminokyseliny, ktoré opäť reagujú s ostatnými zložkami vína. [4, 5]



Obr. č. 4: Katabolismus glukózy [11]

### **2.1.8 Zrenie vína**

Po dokvasení muštu prebieha v mladom víne veľké množstvo biochemických procesov. Tie sú ovplyvnené postupným čistením vína pri vypadávaní nestabilných koloidných látok, autolýzou odumretých kvasiniek a pomalým pôsobením kyslíka vo víne.

Kyslík vo víne je prenášaný najmä oxidačnými enzýmami na rôzne zložky vína za tvorby nových zlúčenín. Oxidačné enzýmy je nutné blokovat' vhodným sírením a udržovať vo víne potrebnú rovnováhu medzi redukujúcimi a oxidačnými látkami.

Zrenie vína je charakteristické vytváraním zlúčenín typu vyšších alkoholov, esterov a aldehydov, ktoré spolu reagujú za prítomnosti kyslíka, trieslovín, bielkovinových látok i aminokyselín. Tieto zlúčeniny tvoria veľmi jemný systém aromatických a chuťových látok, ktorý je zodpovedný za výsledný charakter vína. [5]

### **2.1.9 Ošetrovanie vína**

Po dokončení hlavného kvasenia sa mladé víno prečerpáva a uskladní v pivniciach, kde dochádza časom k dokvaseniu a vyzrážaniu nestabilných koloidných látok z vína. Následne sa mladé víno stáča, filtruje a školí. To znamená, že sa cieľavedomým sírením udržuje vo víne potrebný oxidačno-redukčný potenciál, pri ktorom sa spomaľuje nežiaduca oxidácia citlivých aromatických i chuťových zložiek vína.

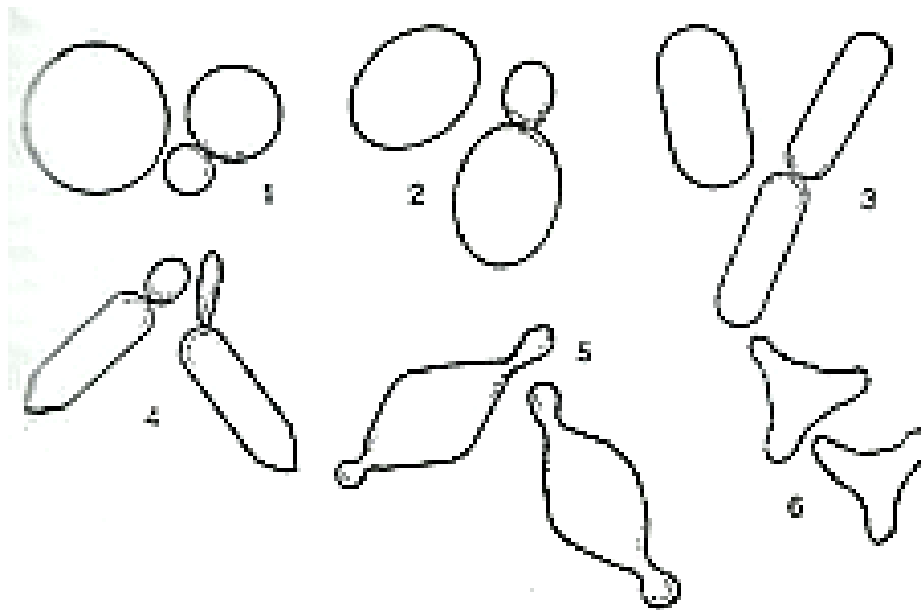
Víno sa pritom neustále vyvíja a dozrieva, až dosiahne takzvanej sudovej zrelosti. V danej dobe je nutné víno stočiť do fliaš, pretože pri dlhšom ležaní v sudoch by sa jeho akosť už len zhoršovala. Tesne pred stáčaním do fliaš sa víno filtruje.

Víno vo fľašiach postupne dozrieva za prítomnosti i malého množstva kyslíka. Ten urýchľuje starnutie vína, pri ktorom sa mení farba vína na žltohnedú až hnedú. Čo sa vône a chuti týka, objavuje sa chuť sušeného ovocia, ktorá prechádza na chuť po karamelu alebo po pečive. [5]

## **2.2 Kvasinky**

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotné organizmy, ktoré patria medzi huby. Názov kvasinky dostali pre schopnosť väčšiny druhov skvasiť monosacharidy i niektoré disacharidy a trisacharidy na etanol a oxid uhličitý. Výskyt kvasiniek v prírode je široký, nachádzajú sa vo vode, pôde, atmosfére i v tráviacom trakte. Vzhľadom ku svojim sacharolytickým schopnostiam ich nájdeme najmä na substrátoch obsahujúcich sacharidy. Rozmnožovanie kvasiniek prebieha buď vegetatívne a to pučaním alebo pohlavne spájaním dvoch haploidných buniek. [10, 12]

Tvar bunky kvasinky (obr. č. 5) súvisí so spôsobom vegetatívneho rozmnožovania, ktoré sa deje buď pučaním alebo delením, ďalej súvisí s výživovými podmienkami i štádiom životného cyklu. Tvar kvasiniek je najčastejšie elipsoidný, vajcovitý alebo guľatý. [8, 10]



**Obr. č. 5:** Tvary buniek kvasiniek. 1 – guľaté, 2 – oválne, elipsoidné, 3 – valčekovité, cylindrické, 4 – ogiválne, 5 – citrónovité, 6 – trojhranné. [13]

## 2.2.1 Cytológia kvasiniek

Kvasinková bunka (obr. č. 6) je zložená zo silnej a pevnej bunkovej steny, cytoplazmy, cytoplazmatickej membrány, ribozómov, mitochondrií (a ďalších organel) a jadra, ktoré je od cytoplazmy oddelené dvojitou jadrovou membránou. [10]

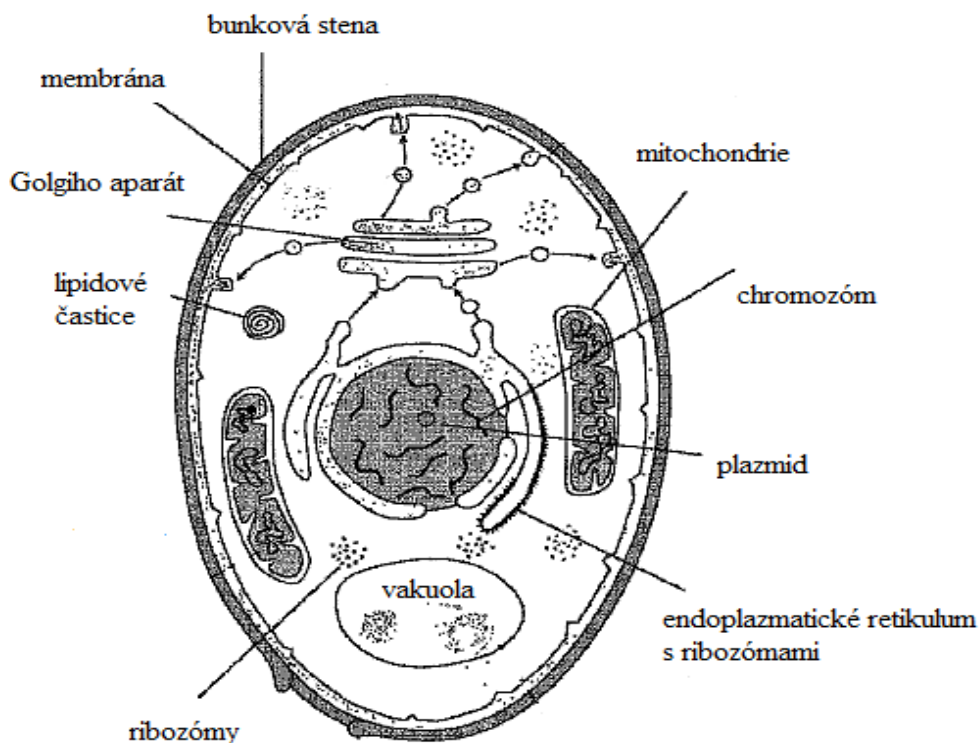
### 2.2.1.1 Bunková stena

Bunková stena má silnú a pevnú štruktúru, ktorá dáva bunke tvar a chráni ju pred mechanickými vplyvmi a osmotickým šokom. Predstavuje 15 až 25 % celkovej hmoty bezvodnej bunky. Veľkými pórami steny môžu prechádzať všetky zlúčeniny okrem zlúčenín vysokomolekulárnych (polysacharidy, bielkoviny).

Hlavnou zložkou bunkovej steny kvasiniek sú polysacharidy, ktoré predstavujú 80 % sušiny steny. V stene kvasiniek sú prítomné i bielkoviny, lipidy s fosfolipidmi a tiež i fosforečnany.

Polysacharidy sú zložené najmä z glukanov, ktoré boli zistené v stenách všetkých doteraz analyzovaných druhov kvasiniek. Pri niektorých druhoch kvasiniek sú v stene prítomné i mannany, glukosamin a chitín.

Pri *S. cerevisiae* je vnútorná vrstva steny zložená z glukanu a bielkovín, potom nasleduje glukomannan s bielkovinami a na povrchu sa nachádzajú mannany s bielkovinami a malým množstvom lipidov. [8, 10]



**Obr. č. 6:** Bunke kvasinky [8]

### 2.2.1.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána je vysoko selektívna bariéra voľne priepustná iba pre malé molekuly bez náboja a tvorí osmotické rozhranie medzi bunkou a vonkajším prostredím. Môže byť opísaná ako lipidová dvojvrstva obklopená globulárnymi bielkovinami. Primárnou úlohou plazmatickej membrány je určiť, čo prejde membránou do cytoplazmy a von z cytoplazmy (je sídlom transportných mechanizmov).

Podobne ako ostatné membrány je i cytoplazmatická membrána zložená z lipidov a bielkovín. Bielkovinové zložky majú hlavne funkciu transportnú, stavebnú a tiež slúžia ako signálne molekuly.

Pri *S. cerevisiae* je plazmatická membrána približne 7,5 nm hrubá a obsahuje 40 % lipidov a 50 % bielkovín. Glukány a mannány sú zastúpené iba v malom množstve. Lipidy sú predovšetkým tvorené fosfolipidmi a sterolmi. [8, 10, 14]

### 2.2.1.3 Cytoplazma

Cytoplazma sa pri mladých bunkách kvasiniek javí vo svetelnom mikroskope ako priehľadná, homogénna hmota a pri starších bunkách sa objavujú zrníčka a jemná alebo väčšia vakuolizácia. V cytoplazme kvasiniek sa nachádza systém dvojitéj membrány (endoplazmatické retikulum). Na vonkajšom povrchu oboch membrán sú zrníčka polyzómov (agregáty ribozómov), v ktorých dochádza k syntéze bielkovín. V cytoplazme sa nachádzajú rozpustené bielkoviny, glykogén, glyoxyzomy, peroxizomy, ribozómy a lipidové častice.

V cytoplazme sa vyskytujú i glykolytické enzýmy a enzýmy zúčastňujúce sa syntézy bielkovín. [10,14]

#### **2.2.1.4 Endoplazmatické retikulum**

ENR je dvojmembránový systém nachádzajúci sa v cytoplazme. Je spojený s cytoplazmatickou a jadrovou membránou. Na ENR sú viazané ribozómy, kde prebieha syntéza bielkovín. Bielkoviny produkované v ENR majú tri možné miesta pôsobenia a to vakuolu, cytoplazmatickú membránu a vonkajšie prostredie. [8]

#### **2.2.1.5 Mitochondrie**

Mitochondrie sú sídlom dýchacích enzýmov a oxidačnej fosforylácie. Mitochondrie sú obklopené dvomi membránami. Vnútna membrána je poskladaná a tvorí kryty. Vonkajšia membrána je priepustná pre väčšinu metabolitov prichádzajúcich z cytosolu v dôsledku obsahu transmembránovej bielkoviny porín o veľkosti 29 kDa. Membrány mitochondrií obsahujú veľké množstvo fosfolipidov, ďalej steroly, bielkoviny a enzýmy. Mitochondrie obsahujú ribozómy a mitochondriálnu DNA bohatú na adenín a tymín. [8, 10]

#### **2.2.1.6 Vakuola**

Vakuola je guľovitý útvar obklopený jednoduchou membránou. Vo vnútri vakuoly sú uložené hydrolytické enzýmy (proteínázy, ribonukleáza, esteráza). Vakuoly majú zrejme podobnú funkciu ako lyzozómy pri vyšších organizmoch. Vakuoly sú miestom, v ktorom dochádza k rozpadu tých štruktúr bunky, ktoré sa neustále v bunke rozkladajú a obnovujú, a ktoré majú krátky polčas rozpadu (mRNA, enzýmy). Vakuoly obsahujú polyfosfáty, draselné ióny, aminokyseliny a puríny, sú teda rezervoárom látok, ktoré sa práve nezúčastňujú metabolizmu. V závislosti na bunkovom cykle majú kvasinky jednu alebo viacero vakuol. [8, 10]

#### **2.2.1.7 Golgiho aparát**

Golgiho aparát má tvar mechúrka a pozostáva z niekoľkých membránových útvarov, ktoré sú prepojené a nachádzajú sa vedľa seba. Úlohou je transportovať prekurzory bunkovej steny z cytoplazmy cez cytoplazmatickú membránu a je tiež zodpovedný za glykozyláciu bielkovín a ich zatriedenie do vakuoly alebo plazmatickej membrány. [8, 10]

#### **2.2.1.8 Cytoskelet**

Cytoskelet je sieť proteínových vláken nachádzajúcich sa v cytoplazme a v jadre, ktorá umožňuje vnútrobunkový pohyb organel z jedného miesta na druhé. V cytoskelete kvasiniek hrajú dôležitú úlohu mikrotubuly, ktoré sú pomerne málo ohybné. Mikrotubuly sú zložené z bielkovín nazývaných tubulíny. [10]

#### **2.2.1.9 Jadro**

Jadro je okrúhla organela s priemerom približne 1,5  $\mu\text{m}$ . Je oddelené od cytoplazmy obalom, ktorý sa nazýva jadrová membrána. Dvojité jadrové membrány obsahujú veľké množstvo otvorov umožňujúcich výmenu malých bielkovín s cytoplazmou. Jadro je umiestnené približne v strede bunky. Roztok nukleoplazma, ktorý je v jadre, obsahuje DNA,

RNA a bielkoviny. Jadro je miestom výskytu chromozómov hrajúcich dôležitú úlohu pri regulácii génov a ich funkcie. Jadro je zodpovedné za syntézu ribozomálnej RNA. V jadre sa nachádza tiež jadierko, ktoré je uložené tesne pod jadrovou membránou. [8, 10, 14]

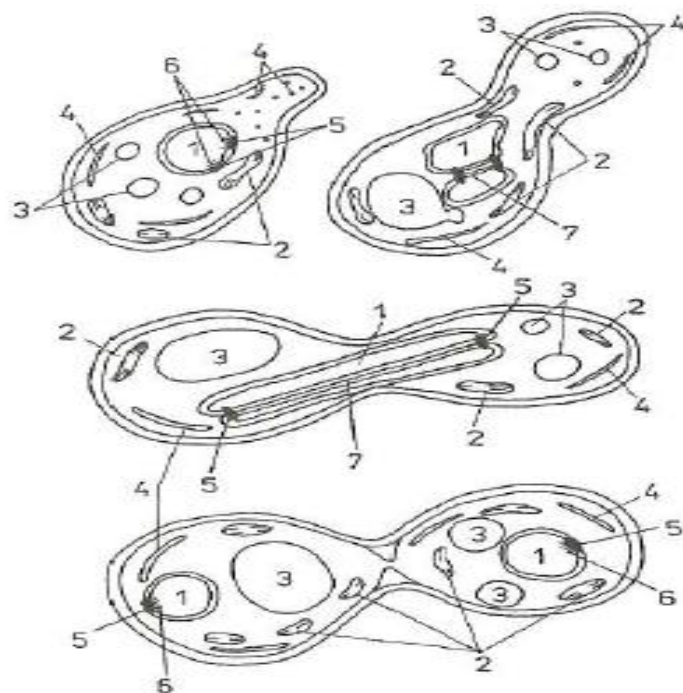
## 2.2.2 Rozmnožovanie kvasiniek

Rozmnožovanie môže byť pri kvasinkách vegetatívne (nepohlavné) a pohlavné. Väčšina kvasiniek sa rozmnožuje nepohlavne.

### 2.2.2.1 Vegetatívne rozmnožovanie

Najčastejšou formou vegetatívneho rozmnožovania kvasiniek je pučanie (obr. č. 7). K pučaniu dochádza vtedy, keď materská bunka dosiahne kritickú veľkosť v čase zhodnom s nástupom syntézy DNA. Následne dochádza k lokálnemu oslabeniu bunkovej steny, čo umožňuje vytlačenie cytoplazmy do oblasti novovznikajúcej dcérskej bunky.

Pri pučaní je vznikajúca dcérska bunka spojená kanálikom s materskou bunkou. Ešte pred pučaním dochádza k splývaniu membrán endoplazmatického retikula a následne k jeho deleniu. Taktiež dochádza k opakovanému deleniu vakuol a ku zmene tvaru mitochondrií. Následne do vznikajúcej dcérskej bunky vstupujú drobné vakuoly a mitochondrie. Súčasne začína mitotické delenie jadra a jeho migrácia k dcérskej bunke. S jadrom do dcérskej bunky prechádzajú tiež ďalšie zložky cytoplazmy. Potom sa cytoplazmatickou membránou uzavrie kanálik medzi materskou a dcérskou bunkou a v dcérskej bunke sa intenzívne syntetizuje a rozširuje endoplazmatické retikulum. Väčšinou sa dcérska bunka po dorastení oddelí od materskej bunky, ale niekedy dochádza k spojeniu buniek a tvorbe bunkových zväzkov. Celý cyklus bunkového delenia trvá pri optimálnych podmienkach okolo dvoch hodín. [10, 14]



**Obr. č. 7:** Schéma pučania kvasiniek. 1 – jadro, 2 – mitochondrie, 3 – vakuola, 4 – ENR, 5 – pólóve teliesko vretienka, 6 – mikrotubuly, 7 – vretienko. [10]

### 2.2.2.2 Pohlavné rozmnožovanie

Pohlavné rozmnožovanie vedie k tvorbe pohlavných spór. Väčšina kvasiniek tvorí ako pohlavné spóry askospóry, čo sú endospóry umiestnené vo vrečku alebo asku. Niektoré kvasinky však tvoria pohlavné exospóry, ktoré sú umiestnené vo vnútri spórotvorných buniek.

Pohlavné rozmnožovanie je charakterizované spájaním dvoch haploidných buniek (konjugáciou) a spájaním ich jadier (karyogamia) za vzniku diploidného jadra. Diploidné jadro sa následne delí meiózou na štyri haploidné jadra, ktoré sú základom pohlavných spór, alebo sa delia ďalšou mitózou a potom vznikajú spóry. V životnom cykle kvasiniek sa strieda haploidná a diploidná fáza buniek.

Pri askospórogénnych kvasinkách dochádza počas spájania dvoch haploidných buniek ihneď i k spojeniu ich jadier za vzniku diploidnej zygoty. Tvar askospór je najčastejšie guľovitý až elipsoidný. Ich povrch je hladký alebo zvrásnený.

Existujú i kvasinky, ktoré tvoria pohlavné haploidné exospóry z bunky nazývanej bazidium. Dané pohlavné spóry sa nazývajú bazidiospóry. Tvorbe bazidiospór predchádza spájanie dvoch pohlavne rozlíšených kvasinkovitých haploidných buniek. Tým vzniká dikaryotické mycélium. Na koncoch tohto heterokaryotického mycélia vyrastá po jednej štíhlejšej bazidii, v ktorej prebieha karyogamia i meióza nasledovaná jednou mitózou alebo niekoľkými po sebe idúcimi mitózami. [10]

Pri *S. cerevisiae* pohlavné rozmnožovanie začína konjugáciou dvoch haploidných buniek opačného párovacieho typu, tiež označených ako  $a$  a  $\alpha$ . Pri konjugácii dochádza ku kontaktu povrchu párovacích buniek a následne k pohybu plazmatickej membrány a vytvoreniu spoločnej cytoplazmy. [14]

Ak sa sporotvorná diploidná bunka kvasinky nachádza v nepriaznivých podmienkach, tak sa prestáva rozmnožovať. Hroznový mušt a víno sú nevhodné prostredia pre sporuláciu kvasiniek a sporulácia sa ani pri nich neobjavuje. [8]

### 2.2.3 Chemické zloženie bunkovej hmoty kvasiniek

Bunková hmota kvasiniek obsahuje 65 až 83 % vody. Obsah vody a zloženie sušiny závisí od druhu kvasiniek, veku bunky a kultivačných podmienok. Hlavný podiel sušiny kvasiniek tvoria bielkoviny (50 %) a glykogén (pri *S. cerevisiae* až 30 %). Nukleové kyseliny predstavujú 10 % sušiny, štruktúrne polysacharidy okolo 5 % a popol okolo 8 %.

Z organických zlúčenín majú z nutričného hľadiska význam najmä vitamíny skupiny B, provitamín D a pri niektorých rodoch i provitamín A. Na vitamíny skupiny B sú bohaté hlavne pivovarské kvasnice, ktoré ho dočerpávajú z mladiny (jej hlavná surovina slad má vysoký obsah daných vitamínov).

Hlavnou zložkou popola je oxid fosforečný, ktorého obsah v sušine je možné regulovať zložením kultivačného prostredia. Z iónov kovov je najviac zastúpený draselný ión. [10]

### 2.2.4 Výskyt kvasiniek a ich význam

Kvasinky a kvasinkovité organizmy sú v prírode veľmi rozšírené. Pretože majú najmä sacharolytické schopnosti, vyskytujú sa na materiáloch obsahujúce cukry (ovocie ako hrozná, slivky a na cukornatých potravinách). Taktiež sú v kvetných nektároch, v pôde, vo vzduchu. Šíria sa rôznymi prenášačmi, ako sú hmyz, vietor. Vo vzduchu je najviac kvasiniek v období

kvitnutia stromov a v čase dozrievania hrozna a sliviek. Dané obdobie prináša najväčšie riziko vzdušnej kontaminácie kvasinkami.

Rozmnožovanie kvasiniek závisí od ich fyziologických vlastností (potreba cukru, odolnosť voči kyslému prostrediu, pri niektorých druhoch tiež tolerancia voči vysokému osmotickému tlaku a neschopnosť štiepenia bielkovín). Kvasinky sa nepremnožujú vo veľkej miere na mäse a bielkovinovom materiále. Výskyt kvasiniek ovplyvňuje i ich nízka tepelná odolnosť. Často kvasinky hynú už pri 2 až 5 minútovom zahrievaní na 56 °C. Rozmnožovanie kvasiniek je väčšinou úplne potlačené pri teplote 38 °C.

Kvasinky sa rozmnožujú oveľa pomalšie ako baktérie, a preto s nimi môžu súťažiť iba za podmienok, ktoré sú pre baktérie nepriaznivé (nízke pH, nízky oxidoredukčný potenciál). [10]

### **2.2.5 Požiadavky na výživu pre kvasinky**

Kvasinky patria medzi chemoorganoheterotrofné organizmy. Energiu a uhlík získavajú z organických zlúčenín, najčastejšie z cukrov. V hroznovom mušte sú zdrojom uhlíka a energie pre kvasinky glukóza a fruktóza. [8, 14]

Vodík je kvasinkou získavaný hlavne zo sacharidov. Vodíkové ióny sú veľmi dôležité pre bunku kvasinky. Pri zmene extracelulárneho alebo intracelulárneho pH môže dôjsť k veľmi vážnej poruche rastu a metabolizmu bunky.

Kvasinky nie sú schopné ideálne rásť pri úplnej absencii kyslíka. Kyslík je substrátom dýchacích enzýmov a tiež je potrebný pre určité typy hydroxylácií vyskytujúcich sa pri biosyntéze sterolov a nenasýtených mastných kyselín. [14]

Hroznové mušty obsahujú dostatočné koncentrácie dusíkatých zlúčenín, minerálov a vitamínov potrebných pre rast a vývoj kvasiniek. Medzi minerály prítomné v mušte patria: draslík, vápnik, sodík, horčík, železo, fosfor, síra, kremík, meď. [8]

## **2.3 Metódy molekulárnej biológie**

V posledných desaťročiach boli klasické metódy identifikácie kvasiniek založené na sledovaní ich fyziologických a morfológických vlastností nahradené modernými metódami molekulárnej biológie, ktoré sú založené na PCR. Výhodou týchto moderných molekulárnych metód je ich relatívne vysoká spoľahlivosť (citlivosť), či rýchlosť získania výsledkov. Metódy molekulárnej biológie sú považované za dobrú alternatívu k tradičným metódam identifikácie mikroorganizmov i preto, že výsledok molekulárnej metódy nezávisí na fyziologickom stave bunky. [15, 16, 17]

### **2.3.1 Polymerázová reťazová reakcia**

Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction) je molekulárna metóda, ktorej princípom je enzymatická amplifikácia DNA in vitro syntézou mnohých kópií vybranej sekvencie DNA v cyklickej reakcii o troch teplotných fázach (obr. č. 8).

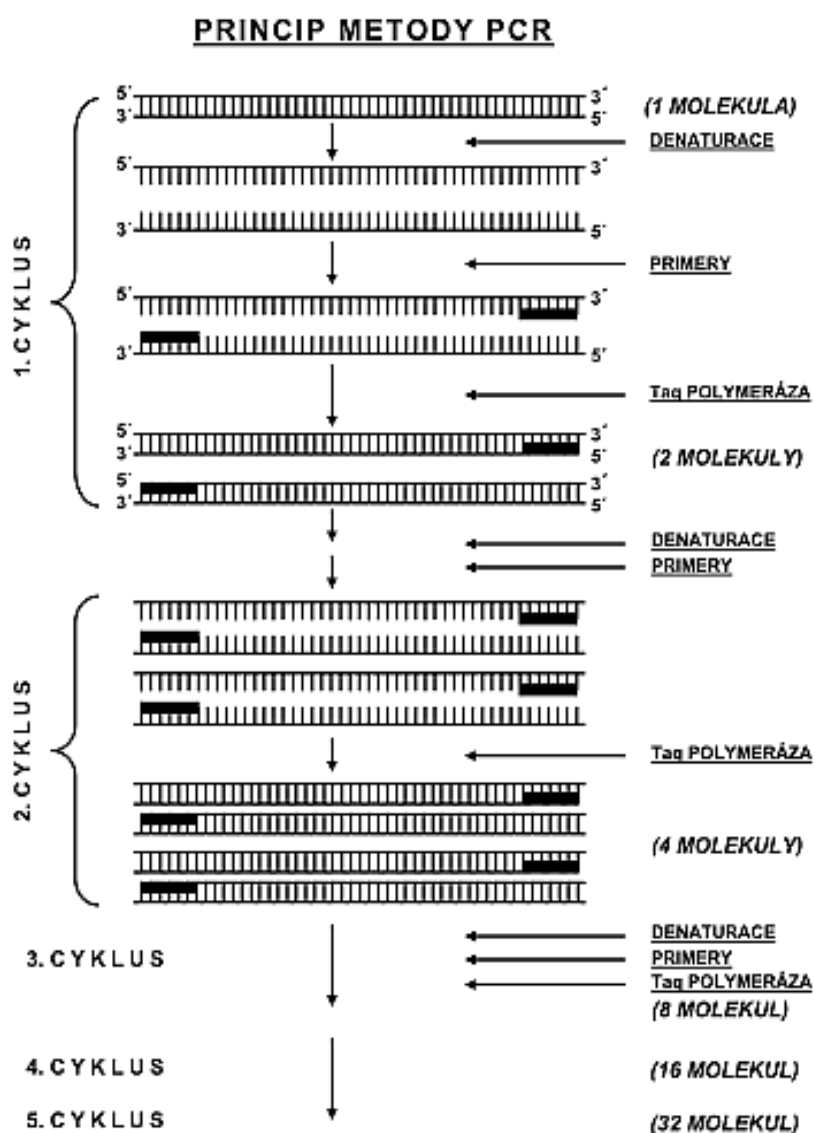
Reakcia je založená na schopnosti dvojvláknovej DNA denaturovať pri vysokej teplote a opätovne renaturovať po jej znížení za zachovania pravidla komplementarity báz. Ak sú známe nukleotidové sekvencie na koncoch určitého regiónu DNA, tak je možné celý tento úsek amplifikovať pomocou PCR.

Podmienkou prevedenia PCR je príprava oligonukleotidových sond, ktoré špecificky hybridizujú na oboch koncoch cieľového úseku DNA a slúžia ako základ pre tvorbu nových vlákien. Syntéza primérov o požadovanej sekvencii prebieha na automatizovaných prístrojoch.

Typická PCR začína tepelnou denaturáciou DNA na dva reťazce pri teplote 95 °C. V ďalšej fáze po ochladení vzorky na 50 až 60 °C dôjde k nasadnutiu primérov na komplementárne 3' konce cieľovej DNA. Priméry sú v PCR reakcii prítomné vo veľkej koncentrácii na rozdiel od dlhých reťazcov analyzovanej DNA, ktoré v danej fáze ostávajú oddelené. Hybridizované priméry slúžia ako základ pre syntézu nových vlákien. Aby bol dostatok substrátu pre syntézu nových vlákien, je v PCR reakcii prítomné dostatočné množstvo deoxynukleotidtrifosfátov. Syntéza nových vlákien je katalyzovaná termostabilnou DNA polymerázou.

Po dokončení syntézy oboch vlákien dôjde k opätovnému zahriatiu na 95 °C, aby došlo k denaturácii novo vytvorených DNA duplexov a celý cyklus začína znova. Opakovanie cyklov denaturácie a syntézy vedie k rýchlemu namnoženiu cieľovej sekvencie DNA.

Po každom cykle dôjde k zdvojnásobeniu počtu kópií úseku medzi nasadnutými priméromi. Množstvo kópií požadovanej sekvencie DNA rastie teda logaritmicky, zatiaľ čo ostatné úseky pôvodnej DNA sa neamplifikujú. Pri optimálnych podmienkach je možné pomocou PCR amplifikovať DNA úseky dlhé až 10 kbp. [18]



Obr. č. 8: Princíp metódy PCR [19]

### 2.3.1.1 Komponenty pre PCR

Na priebeh PCR reakcie sú potrebné nasledovné komponenty:

- a) vzorka DNA so skúmaným úsekom
- b) syntetické oligonukleotidy (priméry), ktoré slúžia ako základ pre syntézu nových vlákien. Najčastejšie dĺžka je 18 až 30 nukleotidov a musia byť syntetizované tak, aby hybridizovali s komplementárnymi sekvenciami na dvojvláknovej DNA
- c) zmes všetkých 4 deoxynukleotidtrifosfátov
- d) Horečnaté ióny ( $Mg^{2+}$ )
- e) Taq polymerázu
- f) PCR pufor

Reakčný ojem je obvykle medzi 20 a 100  $\mu$ l. [18]

### 2.3.1.2 DNA polymeráza

Často používanou DNA polymerázou je DNA polymeráza izolovaná z baktérie *Thermus aquaticus*, ktorá žije v horúcich prameňoch. Je označená ako Taq polymeráza.

Vlákná DNA slúžia ako priméry, na ktorých pomocou DNA polymerázy dôjde k pripojeniu deoxyribonukleotidových jednotiek v smere od 5' konca ku 3' koncu. Daný dej prebieha pri teplote 72 °C. Taq DNA polymeráza je aktívna i pri zahriati na 95 °C nutných k denaturácii. Tepelne rezistentná Taq DNA polymeráza umožňuje teda veľké množstvo amplifikačných cyklov bez nutnosti pridania DNA polymerázy po každej jednej denaturácii. [8, 18]

Pri Taq DNA polymeráze nebola preukázaná aktivita v smere od 3' konca ku 5' koncu, čo znamená, že daná polymeráza nie je schopná spätne opraviť chyby, ku ktorým dochádza počas syntézy nového vlákna. Výsledný produkt PCR teda obsahuje kópie kópií a polymerázou vnesená chyba sa násobí. Výsledné fragmenty obsahujú kópie predchádzajúcich chýb a k tomu prípadne i nové chyby vnesené počas posledného cyklu syntézy. [20]

### 2.3.1.3 Priméry pre PCR

Priméry môžu byť považované za základ úspešnej PCR. Ak sú priméry navrhnuté správne, dôjde k amplifikácii jediného správneho úseku templátovej DNA. Hlavným predpokladom správnej hybridizácie primérov s templátovou DNA je, že priméry s ňou dokonale korešpondujú.

Dĺžka priméru je jedným z dôležitých faktorov. Ak sú priméry príliš krátke, môžu hybridizovať s viacerými cieľovými miestami na DNA a vznikne tak celá skupina nežiaducich produktov. Ak sú priméry dlhšie (viac ako 20 nukleotidov), tak dané priméry už majú nepriaznivý vplyv na rýchlosť hybridizácie – hybridizácia prebieha pomalšie. [20]

### 2.3.2 Restričné endonukleázy

Restričné endonukleázy sú bakteriálne enzýmy chrániace baktériu pred vniknutím cudzorodej DNA. Ochrana baktérie spočíva v tom, že kým cudzia dvojvláknová DNA je restriktázou rozštiepená, vlastná DNA je proti pôsobeniu enzýmu chránená (najčastejšie metyláciou niektorých báz). Restričné endonukleázy sú schopné štiepiť dvojvláknové molekuly DNA akéhokoľvek pôvodu, pokiaľ v nich existujú pre ne špecifické cieľové miesta štiepenia. [19]

### 2.3.3 PCR-RFLP

Podstata metódy PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfizmus dĺžok restričných fragmentov) spočíva v prvotnom namnožení dostatočného množstva PCR produktu a následnom využití restričných endonukleáz, ktoré štiepia polynukleotidový reťazec prerušením fosfodiesterovej väzby v určitých špecifických sekvenciách.

Získané fragmenty, ktorých veľkosť a počet závisí od prítomnosti štiepneho miesta sa detegujú elektroforézou v agarózovom géle s obsahom etídiu bromidu. Fragmenty DNA

majú záporný náboj, preto všetky fragmenty putujú od záporne nabitej elektródy k elektróde kladnej. [19, 21]

#### **2.3.4 Elektroforéza**

Pri elektroforéze dochádza k migrácii nabitých častíc v rovnakosmernom elektrickom poli. Dané elektrické pole sa vytvára vkladáním konštantného rovnakosmerného napätia medzi elektródy.

V zónovej elektroforéze je prostredie medzi elektródami tvorené základným elektrolytom, ktorý zaisťuje dostatočnú elektrickú vodivosť v celom systéme. Vzorka je dávkaná na určité miesto daného systému (spravidla sa nanesie do stredu nosiča).

Po vložení napätia dochádza k migrácii kationov k zápornému pólu a aniónov k pólu kladnému. Neutrálne molekuly sa nepohybujú. Vplyvom odlišnej rýchlosti migrácie zložiek vzorky sa v priebehu separácie tvoria oddelené zóny zložiek. Počas separácie sa dostávajú dopredu nabité častice s väčšou pohyblivosťou a oneskorujú sa častice s menšou pohyblivosťou. Tým dochádza k ich oddeleniu. Separácia je zakončená skôr než dorazia prvé zóny ku koncu.

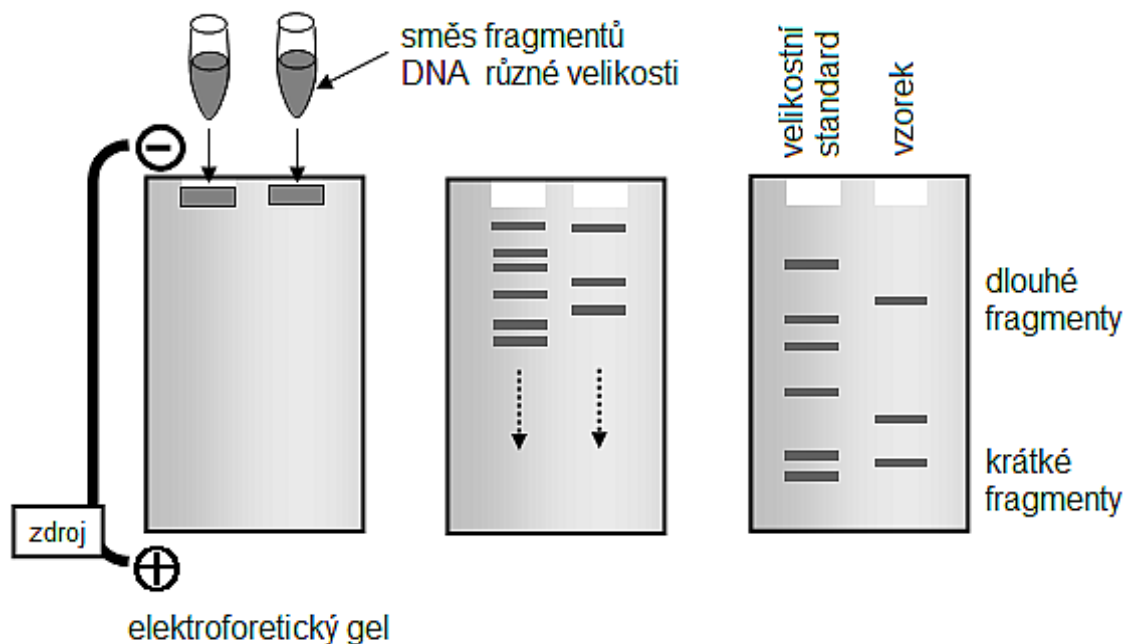
Zóny sa detegujú a vyhodnocujú až po separácii. Separáciu nie je možné urýchliť použitím vyšších hodnôt napätia, pretože vznikajúce Jouleovo teplo by mohlo spôsobiť chemické zmeny a ohroziť separáciu. [22]

#### **2.3.5 Agarózová gélová elektroforéza**

Produkty restrikčných alebo amplifikačných reakcií sa delia podľa svojej relatívnej molekulovej hmotnosti a veľkosti náboja agarózovou elektroforézou DNA fragmentov v géle (obr. č. 9). Pri gélovej elektroforéze sa uplatňuje pri separácii okrem elektroforetickej pohyblivosti i molekulový sitový efekt.

Najčastejšie sa ako médium (nosič) používa agaróza s koncentráciou 0,8 až 3,5 %. Jej koncentrácia sa volí podľa veľkosti fragmentov, ktoré majú byť separované (tabuľka 1).

Príprava agarózového gélu spočíva v rozvarení určitého množstva agarózy v elektroforetickom pufre, pridaní interkalačného činidla (napríklad etídium bromid) a jej vytuhnutí pri izbovej teplote. Samotná koncentrácia agarózy určuje veľkosť pórov v géle a tým i priepustnosť pre jednotlivé fragmenty DNA. [21, 22]



**Obr. č. 9:** Schéma gélovej elektroforézy [29]

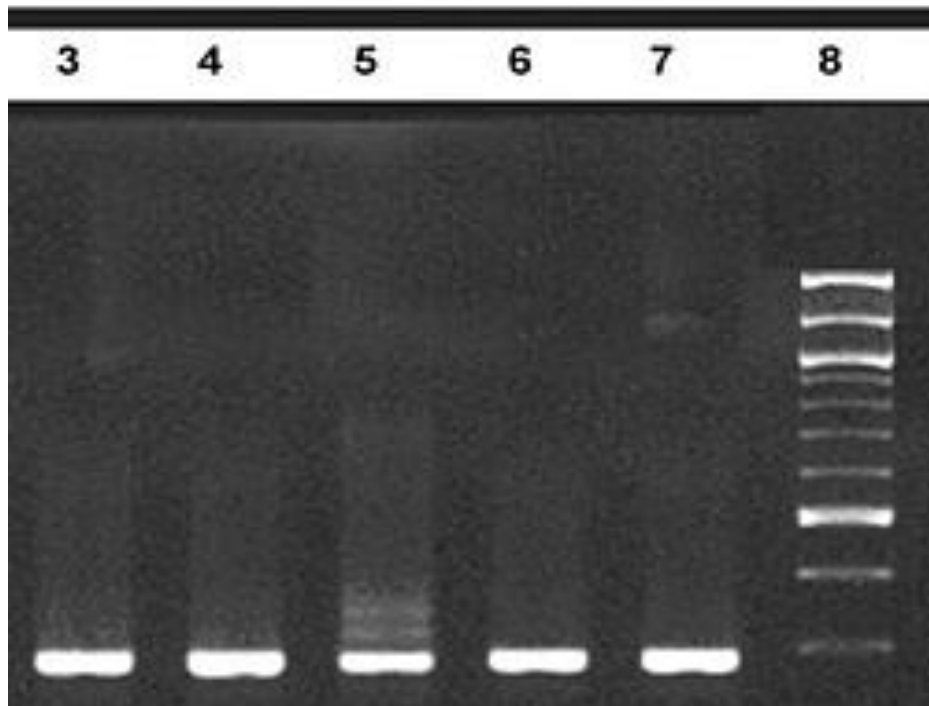
**Tab. č. 1:** Vzťah koncentrácie agarózy k dĺžke DNA fragmentov [21]

Množstvo agarózy v géle (%)	Dĺžka fragmentov (kb)
0,3	od 60 po 5
0,6	od 20 po 1
0,7	od 10 po 0,8
0,9	od 7 po 0,5
1,2	od 6 po 0,4
1,5	od 4 po 0,2
2,0	od 3 po 0,1
3,0	od 2 po 0,3

### 2.3.6 Vizualizácia elektroforetických gélov

Najčastejšou interkalačnou látkou používanou pri vizualizácii fragmentov DNA je etídium bromid, ktorý sa dokáže včleniť medzi nukleotidy molekuly DNA a pri použití UV transluminátora dochádza k vizualizácii DNA a jej špecifických fragmentov. (obr. č. 10) Veľkou nevýhodou etídium bromidu je jeho vysoká toxicita a mutabilita, preto je potrebné dodržiavať bezpečnostné opatrenia.

Okrem etídium bromidu sa využívajú i niektoré ďalšie interkalačné farbivá. Môžeme sem zahrnúť SYBR<sup>®</sup> Green alebo GoldView<sup>®</sup>. [21]



**Obr. č. 10:** Vyhodnotenie PCR reakcie za použitia etídium bromidu [30]

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Mikroorganizmy

Použité kmene kvasiniek pochádzali zo zbierky mikroorganizmov CCY – Culture Collection of Yeasts, Chemický ústav, Bratislava, Slovensko.

*Kluyveromyces lactis* (Francúzsko), *Pichia jadinii* (kvasinky z krmív, Česká republika), *Debaryomyces hansenii* (semená bavlníka), *Debaryomyces hansenii* (list orecha, Severná Kórea), *Kluyveromyces marxianus* (rezky cukrovej repy, Slovensko), *Kluyveromyces marxianus* (cukrovar, Slovensko), *Cryptococcus sp.* (Phragmites australis, listy), *Bulleromyces albus* (plody slivky, Slovensko), *Candida boidinii* (synonymum *C. olivarum*, olivy, Taliansko), *Candida oleophila* (plody hrušky).

Ďalšie kvasinky, ktoré boli testované, pochádzali z muštu odrody Hibernál, Vinárstvo Štěpán Maňák, Žadovice. Kvasinky boli izolované v období október až november 2015 (mušt odrody Hibernál).

### 3.2 Chemikálie

Agaróza pre elektroforézu (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)

Dĺžkový štandard 20 bp a 100 bp (Elizabeth Pharmacon s.r.o., ČR)

dNTP mix (Invitak, Nemecko)

EDTA

Etanol

Etídium bromid (Serva Bitech, Nemecko)

Hydroxid sodný

Kvasničný extrakt (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, India)

Kyselina boritá

Kyselina chlorovodíková

Kyselina propiónová

Octan sodný

Parafínový olej

Priméry ITS1, ITS4 (Invitak, Nemecko)

Restrikčné endonukleázy – HinfI, HaeIII, HhaI, TaqI<sup>α</sup> (BioLabs, TaKaRa)

Sada Ultra Clean<sup>TM</sup> Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon spol. s.r.o., ČR)

Sladina (pivovar Brno)

Sterilná a deionizovaná voda

Taq DNA polymeráza (Invitak, Nemecko)

Taq pufoer pre PCR mix (Invitak, Nemecko)

Tris

### 3.3 Prístroje a pomôcky

Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)

Bakteriologické kľučky

Buničitá vata

Centrifúga Eppendorf 5430 R (Eppendorf AG, Nemecko)

Elektroforetická vaňa Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (Biotech s.r.o., ČR)  
Exsikátor  
Chladnička a mraznička  
Laboratórne sklo  
Mekerov kahan  
Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)  
Mikropipety pipet4u (AHN Biotechnologie GmbH, Nemecko)  
Mikroskúmavky Eppendorf  
Mikrovlnka  
Minicentrifúga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)  
Parafilm (American Nacional Can<sup>TM</sup>, USA)  
PCR box AURA MINI (Bioair Instruments, Taliansko)  
Petriho misky  
Predvážky EK – 600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)  
Sterilný box pre mikrobiologickú prácu  
Termocyklér PTC – 100<sup>TM</sup>, (MJ Research, Inc, USA)  
Termostat IP 100 – U (LTE SCIENTIFIC, Veľká Británia)  
Transluminátor (Ultra Lum. Inc, USA)  
Vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR)  
Vortex-Genie 2, MO Bio (Biotech s.r.o., ČR)

### **3.4 Kultivačné médiá a použité roztoky**

#### **3.4.1 Príprava kultivačného média**

Kultivačné médium pre izoláciu kvasiniek bolo pripravené zo sladínového extraktu. Sladina sa získava extrakciou jačmenného sladu vo vode. Sladina o objeme 200 cm<sup>3</sup> bola naliata do odmerného valca o objeme 500 cm<sup>3</sup> a následne zriedená vodou na požadovanú cukornatosť. Pomocou uhličitanu sodného bolo pH roztoku upravené na 6,8. Upravený roztok bol naliaty do Erlenmayerovej banky a následne bola k nemu pridaná agaróza v požadovanej koncentrácii. Vzniknutá zmes bola privedená k varu. Vzniknuté kultivačné médium bolo v množstve približne 15 cm<sup>3</sup> naliate do Petriho misky. Na prípravu šikmého agaru bol do skúmavky pipetovaný objem sterilného média odpovedajúci štvrtine objemu skúmavky. [23]

#### **3.4.2 Príprava kultivačného média s antibiotikom a kyselinou propiónovou**

Bolo navážených 0,12 g streptomycin sulfátu a dané množstvo bolo rozpustené v 10 cm<sup>3</sup> destilovanej vody. Pripravený roztok antibiotika bol pridaný do média v Erlenmayerovej banke o objeme 150 cm<sup>3</sup>. Taktiež bolo navážených 0,375 g kyseliny propiónovej a dané množstvo bolo tiež pridané do Erlenmayerovej banky. Takto pripravené médium bolo rozliate do Petriho misiek (v počte 10 kusov Petriho misiek). [23]

#### **3.4.3 Príprava 10x TBE pufru**

Bolo navážených 9,36 g EDTA a prevedených do kadičky. K EDTA bolo pridaných 20 cm<sup>3</sup> destilovanej vody a pH bolo upravené pomocou NaOH na hodnotu 8. Obsah kadičky bol

30 minút miešaný na elektrickej miešačke do úplného rozpustenia EDTA. Vzniknutý roztok bol prevedený do odmernej banky o objeme 50 cm<sup>3</sup> a doplnený destilovanou vodou po rysku. Z daného roztoku bolo odobraných 40 cm<sup>3</sup> a naliatych do 1 000 cm<sup>3</sup> odmernej banky. K roztoku bolo pridaných 108 g Tris a 55 g kyseliny boritej. Po rozpustení bol obsah banky doplnený destilovanou vodou po rysku. [24]

#### **3.4.4 Príprava 1x TBE pufru**

1x TBE pufr bol použitý na prípravu gélu pre elektroforetickú detekciu. Zo zásobného roztoku 10x TBE pufru bolo odpipetovaných 100 cm<sup>3</sup> do odmernej banky s objemom 1 000 cm<sup>3</sup> a doplnených destilovanou vodou po rysku. [24]

#### **3.4.5 Príprava 1x TBE pufru s etídium bromidom**

K pripravenému 1x TBE pufru v odmernej banke o objeme 1 000 cm<sup>3</sup> bolo pridaných 100 µl etídium bromidu. Takto pripravený roztok bol použitý ako pufr pri elektroforetickej detekcii.

#### **3.4.6 Príprava etídium bromidu**

Zásobný roztok etídium bromidu bol pripravený navážením 10 mg etídium bromidu a jeho rozpustením 1 cm<sup>3</sup> destilovanej vody v mikroskúmavke Eppendorf. Takto pripravený roztok bol ďalej používaný pre vizualizáciu fragmentov DNA na géle. [24]

#### **3.4.7 Príprava 2 % agarózového gélu**

Agarózový gél bol pripravený navážením 2 g agarózy na 100 cm<sup>3</sup> 1x TBE pufru. Po naliati požadovaného objemu TBE pufru k agaróze v Erlenmayerovej banke bola zmes opakovaným varom v mikrovlnke dokonale rozpustená. Po ochladení bol napipetovaný roztok etídium bromidu v objeme 1:10000 vzhľadom k objemu pridaného pufru.

#### **3.4.8 Príprava dĺžkového štandardu 100 bp**

Dĺžkový štandard 100 bp bol dodaný vo forme pripravenej priamo k pipetovaniu na gél. Štandard 100 bp bol na gél nanášaný v objeme 3 µl.

#### **3.4.9 Príprava octanového pufru (3 mol·dm<sup>-3</sup>)**

Octan sodný o hmotnosti 2,46 g bol rozpustený v 7 cm<sup>3</sup> destilovanej vody. Pridaním kyseliny chlorovodíkovej bolo pH roztoku upravené na hodnotu 5,5. Roztok bol následne prevedený do odmernej banky o objeme 10 cm<sup>3</sup> a doplnený destilovanou vodou po rysku. Pripravený roztok bol uložený pri 4 °C v chladničke. [24]

#### **3.4.10 Príprava 80 % etanolu**

Bolo napipetovaných 1,6 cm<sup>3</sup> 96 % etanolu a k danému množstvu bolo pridaných 0,32 cm<sup>3</sup> destilovanej vody. Roztok bol krátko zvertexovaný a uchovaný v mrazničke pri teplote –20°C.

### 3.4.11 Príprava PCR zmesi

PCR zmes bola pripravená zmiešaním všetkých potrebných PCR komponentov. Jednotlivé objemy pridaných komponentov sú uvedené v tabuľke č. 2.

**Tab. č. 2:** PCR komponenty pre prípravu PCR zmesi

PCR komponenty	Objem [ $\mu$ l]
sterilná voda	128,7
pufor	15,0
dNTP mix	3,0
primér ITS1	0,6
primér ITS4	0,6

K vzniknutému MasterMixu v množstve 147,9  $\mu$ l bolo pridaných 1,5  $\mu$ l templátovej DNA a 0,6  $\mu$ l termostabilnej Taq polymerázy. Pri negatívnej kontrole bola miesto templátovej DNA pipetovaná sterilná voda v objeme 1,5  $\mu$ l.

## 3.5 Pracovný postup

### 3.5.1 Izolácia čistých kultúr kvasiniek

Vzorky muštov boli odobrané od 28.10.2015 do 9.11.2015 z vinice Vinařství Štěpán Maňák v Žádovicích (juh Moravy). Dané vzorky boli sterilne filtrované. Mikrobiologický filtračný papier s odfiltrovanou biomasou bol presunutý do Petriho misky na sladínové živné médium s antibiotikom a kyselinou propiónovou. Takto naočkované Petriho misky boli uskladnené po dobu niekoľkých dní v termostate pri teplote 26 °C.

### 3.5.2 Kochova zried'ovacia metóda

Z namnožených zmiešaných kultúr boli izolované čisté kultúry opakovaným zried'ovaním Kochovou metódou.

V sterilnom boxe boli nachystané tri skúmavky so sterilnou vodou. V prvých dvoch bolo napipetovaných 10 cm<sup>3</sup> vody a v tretej 9 cm<sup>3</sup>. Z Petriho misky boli pomocou kľučky odobrané dve očká kultúry a prenesené do prvej skúmavky s 10 cm<sup>3</sup> sterilnej vody. Obsah skúmavky bol premiešaný pomocou vortexu a následne bolo z danej skúmavky odpipetovaných 50  $\mu$ l a prenesených do ďalšej skúmavky s objemom 10 cm<sup>3</sup>. Obsah danej skúmavky bol opäť zvortexovaný a následne bol prenesený 1 cm<sup>3</sup> objemu skúmavky do tretej skúmavky s objemom 9 cm<sup>3</sup> vody. Po premiešaní bolo z tretej skúmavky odobratých 50  $\mu$ l suspenzie a napipetovaných na Petriho misku so sladinou. Daná suspenzia bola rozotrená hokejkou a vložená do termostatu.

Naočkované Petriho misky boli vždy uložené v termostate niekoľko dní pri teplote 26 °C kvôli dobrému namnoženiu kvasinkových kultúr. Pre prvé a druhé riedenie bolo použité sladínové živné médium s antibiotikom a kyselinou propiónovou na vylúčenie nežiaducich plesní a baktérií. Na ďalšie zried'ovania a množenia bolo použité médium bez antibiotika a kyseliny propiónovej. Proces Kochovho riedenia s následným namnožením oddelených

kultúr bol opakovaný šesťkrát až sedemkrát. Získané čisté kultúry boli skontrolované v mikroskope a boli prípadne vylúčené kultúry obsahujúce bakteriálne kolónie.

### 3.5.3 Izolácia DNA

Izolácia kvasinkovej DNA bola uskutočnená pomocou komerčného setu Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit podľa priloženého návodu.

Do rozbíjajúcej mikroskúmavky bol pipetovaný rozbíjajúci pufor v objeme 300 µl, v ktorom bola následne rozsuspendovaná kvasinková kultúra (očkovacou kľučkou boli nabraté dve očká kultúry kvasiniek). K danej zmesi bolo napipetovaných 50 µl roztoku MD1. Mikroskúmavky boli vložené v horizontálnej polohe do adaptéru vortexu a boli 10 minút vortexované pri maximálnej rýchlosti. Následne bola zmes v mikroskúmavke centrifugovaná 1 minútu pri 10 000 otáčkach a teplote 4 °C. Všetky centrifugácie prebiehali pri rovnakých podmienkach. Približne 350 µl supernatantu bolo preneseného do čistej mikroskúmavky a bolo k nemu pridaných 100 µl roztoku MD2. Táto zmes bola krátko zvortexovaná a inkubovaná pri teplote 4 °C v chladničke po dobu 5 minút. Následne bola zmes centrifugovaná a získaný supernatant (približne 450 µl) bol prenesený do čistej mikroskúmavky a k nemu bolo pridaných 900 µl roztoku MD3 a zmes bola zvortexovaná. 700 µl roztoku bolo následne pipetovaného do novej mikroskúmavky s kolónkou (priamo na kolónku) a scentrifugovaných. Prefiltrovaný roztok bol odstránený a na rovnakú kolónku bolo pipetovaných zvyšných (asi 300 µl) roztoku a znovu scentrifugovaných. Prefiltrovaný roztok bol opäť odstránený a na rovnakú kolónku bolo pridaných 300 µl roztoku MD4 a roztok bol znovu scentrifugovaný. Kolónka bola následne prenesená do čistej mikroskúmavky a do stredu kolónky bolo napipetovaných 50 µl roztoku MD5 a znovu prebehla centrifugácia. Kolónka bola následne odstránená a roztok DNA bol uschovaný v mrazničke pri – 20 °C.

### 3.5.4 PCR

Z pripravenej PCR zmesi (kapitola 3.4.11) bolo pipetovaných 147,9 µl do mikroskúmavky o objeme 0,5 cm<sup>3</sup> a k tomuto množstvu bolo pridaných 1,5 µl izolovanej DNA a 0,6 µl Taq polymerázy. V prípade negatívnej kontroly bola miesto templátovej DNA pipetovaná voda v množstve 0,6 µl. Roztok bol zvortexovaný a vložený do termocykléru, kde bola templátová DNA namnožená pomocou PCR podľa teplotného a časového profilu uvedeného v tabuľke č. 3.

**Tab. č. 3:** Teplotný a časový profil PCR

Jednotlivé kroky		Teplota [°C]	Čas [min]
počiatočná denaturácia		94	4
denaturácia	25 cyklov	94	1
pripojenie primérov		48	0,5
polymerácia		72	1
elongácia		72	10

K amplifikácii v oblasti 5,8S-ITS rDNA boli použité priméry ITS1 a ITS4. Sekvencie jednotlivých primérov sú zhrnuté v tabuľke č. 4.

**Tab. č. 4:** Priméry a ich sekvencie

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

### 3.5.5 Prečistenie PCR produktu

PCR produkt je nutné pred samotnou restriktčnou analýzou prečistiť. 20 µl amplifikovanej DNA bolo zmiešaných s 2 µl octanového pufru. Roztok bol krátko zvortexovaný a následne bolo k nemu pridaných 60 µl 96 % etanolu, ktorý bol vychladený na teplotu – 20°C. Daný roztok bol následne centrifugovaný 30 minút pri 4 °C a 14 000 otáčkach. Supernatant bol dekantovaný a prebytočný roztok vyliaty. K supernatantu bolo pipetovaných 60 µl 80 % etanolu a obsah bol centrifugovaný pri rovnakých podmienkach. Nadbytočný roztok bol znovu vyliaty a zvyšok etanolu v mikroskúmavke bol vysušený v exsikátore po dobu 10 minút.

### 3.5.6 Restriktčná analýza

K prečistenému PCR produktu bolo pipetovaných 13,4 µl sterilnej vody, 1,5 µl pufru a 0,1 µl enzýmu. Tieto množstvá boli zvolené na základe doporučení výrobcov. Vzorky boli následne inkubované v termocykléri pri teplote 37 °C počas 16 hodín a následne bolo teplota zvýšená kvôli inaktivácii enzýmu na čas 20 minút. Záverečné teploty sa líšili podľa zvoleného enzýmu (tabuľka č. 5). Výsledne produkty boli elektroforeticky detekované.

**Tab. č. 5:** Vlastnosti použitých restriktčných endonukleáz

Označenie enzýmu	Producent enzýmu	Rozpoznávacie miesto na sekvencii DNA	teplota inkubácie [°C] 16 hodín	teplota inaktivácie [°C] 20 minút
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'...GG↓CC...3' 3'...CC↑GG...5'	37	80
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'...C↓ATC...3' 5'...CTA↑G...3'	37	80
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'...GCG↓C...3' 5'...C↑GCG...3'	37	65
<i>TaqI<sup>a</sup></i>	<i>Thermus aquaticus</i>	5'...T↓CGA...3' 3'...AGC↑T...5'	37	80

### 3.5.7 Elektroforetická detekcia PCR produktov a restriktčných fragmentov

PCR produkty i restriktčné fragmenty boli detekované pomocou elektroforézy na 2 % agarózovom géle. Podľa počtu vzoriek boli použité elektroforetické vane o rôznej veľkosti. Pri veľkej vani (50 jamôk) bol gél pripravený v objeme 100 cm<sup>3</sup>, pri strednej vani (20 jamôk) mal gél objem 60 cm<sup>3</sup> a pri malej vani (14 jamôk) mal gél objem 40 cm<sup>3</sup>. Ku gélu bol

následne (ešte pred úplným vychladnutím) pridaný etídium bromid v objeme odpovedajúcom 1/10 000 objemu gélu.

Vzorky boli na gél nanášané zmiešaním 1 µl nanášacieho pufru s 5 µl vzorky a 5 µl daného roztoku bolo pipetované do jamky na géle. Negatívna kontrola bola pri PCR nanesená rovnakým spôsobom. Pozitívna kontrola pri restrikčnej analýze bola uskutočnená tak, že bol nanesený PCR produkt zhodujúci sa s dĺžkou amplikónu, ktorý bol pre restrikčnú analýzu použitý. Do krajných jamôk na géle bol nanesený dĺžkový štandard 100 bp v objeme 3 µl.

Delenie fragmentov prebiehalo vo veľkej vani pri konštantnom napätí 60 V počas 3 hodín. V strednej vani bolo použité napätie 55 V a čas 2,5 hodiny a v malej vani napätie 45 V a čas 2 hodiny.

Po ukončení elektroforézy bol gél prenesený do transluminátora a pod UV svetlom bol gél vyfotený pomocou programu Scion Image.

### **3.5.8 Spracovanie výsledkov pomocou programu BioNumerics**

Pomocou programu BioNumerics boli na základe UPGMA (unweighted pair-group average) zhlukovej (klastrovej) analýzy vytvorené dendrogramy genetickej podobnosti identifikovaných kvasiniek.

Klastrová analýza patrí medzi metódy, ktoré sa zaoberajú rozdelením väčšieho množstva premenných do tried (klastrov) podľa ich podobnosti. V biológii sa využíva k taxonomickému zaradeniu organizmov, v medicíne k analýze ochorenia.

Súbor dát je rozdelený do klastrov vždy s ohľadom na určité znaky. V programe BioNumerics ide o veľkosti označených fragmentov na elektroforetickom géle.

V prípade, kedy porovnávané objekty majú hodnotené znaky nemetrickeho charakteru, využíva klastrová analýza koeficienty podobnosti. Pri hodnotení genetickej podobnosti identifikovaných kvasiniek bol využitý Jaccardov koeficient.

V programe BioNumerics sa hodnotí genetická podobnosť na základe metódy UPGMA klastrovej analýzy, čo je najjednoduchšia metóda získavania fylogenetických stromov. Metóda UPGMA (tiež metóda priemernej vzdialenosti) berie za vzdialenosť medzi dvoma zhlukmi priemer vzdialenosti medzi všetkými párami objektov daných zhlukov. Výsledkom je, že taxóny, ktoré sú si najviac podobné, budú mať medzi sebou najkratšiu vzdialenosť. Týmto vzniká grafické spracovanie hierarchicky usporiadaných klastrov vo forme dendrogramu. [25, 26]

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Identifikácia kvasiniek izolovaných z muštu

Cieľom práce bolo identifikovať a taxonomicky zaradiť kvasinky izolované z muštu odrody Hibernál. Pre moju diplomovú prácu boli vybrané vzorky s pracovným označením 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 22, 23, 24 a 25 (dané vzorky pochádzali z muštu odrody Hibernál).

#### 4.1.1 Kultivácia kvasiniek

Vzorky muštu pre izoláciu a identifikáciu kvasiniek boli odoberané do sterilných nádob. Tabuľka číslo 6 znázorňuje dátumy jednotlivých odberov vzoriek.

Odoberané vzorky muštu boli sterilne filtrované cez mikrobiologický filter. Mikrobiologický filtračný papier s odfiltrovanou biomasou bol následne presunutý do Petriho misky na sladínové živné médium s antibiotikom a kyselinou propiónovou. Takto naočkované Petriho misky boli uskladnené po dobu niekoľkých dní v termostate pri teplote 26 °C. Z namnožených zmiešaných kultúr boli získané čisté kultúry využitím Kochovej zriedovacej metódy (kapitola 3.5.2). Získané čisté kultúry boli pozorované mikroskopom a kultúry obsahujúce baktérie boli vylúčené.

Tab. č. 6: Dátumy odberov vzoriek muštu

Odber	Dátum odberu
HIB-0 (pred zaočkovaním – 1. odber)	28.10.2015
zaočkovanie	30.10.2015
HIB-1 (2. odber)	2.11.2015
HIB-2 (3. odber)	4.11.2015
HIB-3 (4. odber)	6.11.2015
HIB-4 (5. odber)	9.11.2015

#### 4.1.2 Izolácia DNA

Izolácia kvasinkovej DNA prebiehala využitím komerčného setu ULTRA CLEAN™ Microbial DNA Isolation Kit (kapitola 3.5.3). Vyizolovaná DNA pre ďalšie použitie bola uložená v mrazničke pri teplote – 20°C.

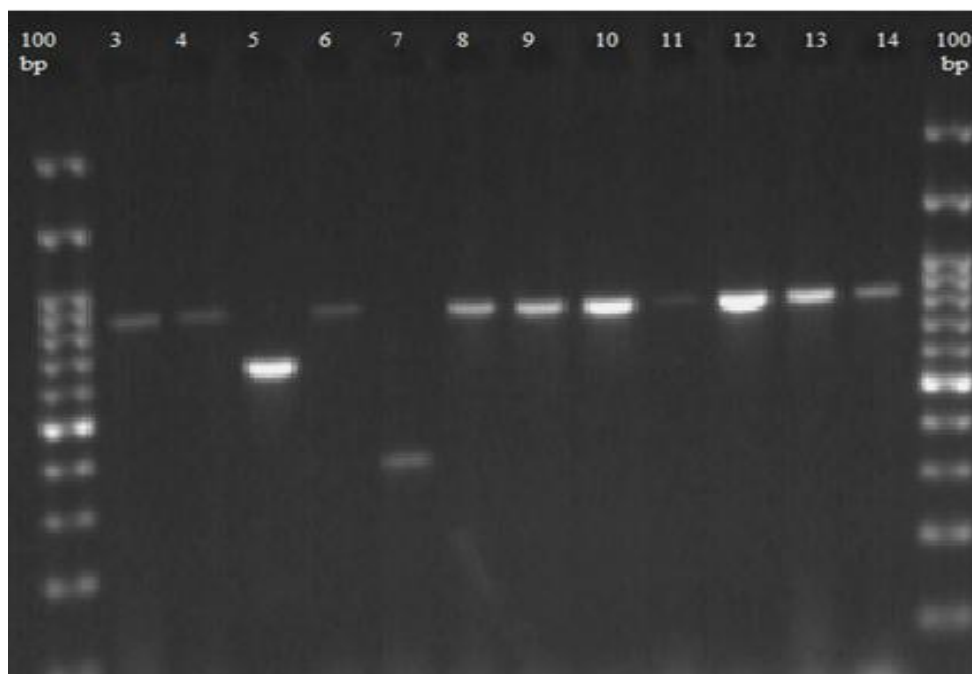
#### 4.1.3 Amplifikácia izolovanej DNA (pomocou PCR)

Izolovaná DNA z čistých kvasinkových kultúr bola amplifikovaná pomocou PCR (kapitola 3.5.4). PCR produkty boli následne detekované elektroforézou na 2 % agarózovom géle.

Vyhodnotením amplifikovaných fragmentov boli vytvorené tri skupiny o veľkosti 880 bp, 650 bp a 380 bp. Porovnaním veľkostí fragmentov s databázami (zoznam použitej literatúry, č. 27 a 28) kvasiniek bolo zistené, že pri fragmentoch o veľkosti 880 bp sa jedná o kvasinky rodu *Saccharomyces*. Pri fragmentoch o veľkostiach 650 bp a 380 bp sa jedná o kvasinky rodu *Pichia*. Veľkosti jednotlivých fragmentov sú zhrnuté v tabuľke č. 7. Obrázok č. 11 zobrazuje elektroforeogram PCR produktov izolovaných kvasiniek.

**Tab. č. 7:** Veľkosti fragmentov PCR produktov izolovaných kvasiniek z muštu

Pracovné označenie	Odber č.	Veľkosť PCR produktu [bp]
1	4	880
3	5	880
4	5	880
5	1	650
6	2	880
7	1	380
8	3	880
11	5	880
12	5	880
13	5	880
15	4	880
16	4	880
17	4	880
19	4	880
22	2	880
23	1	380
24	1	380
25	3	880



**Obr. č. 11:** Ukážka elektroforeogramu PCR produktov izolovaných kvasiniek z muštu, 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, čísla 3 až 14 sú pracovné označenia jednotlivých vzoriek

#### 4.1.4 Restrikčná analýza

Naamplifikované úseky DNA jednotlivých izolovaných kvasiniek boli podrobené restrikčnej analýze (kapitola 3.5.6). Samotnej restrikčnej analýze predchádzalo prečistenie PCR produktu (kapitola 3.5.5). Pre restrikčnú analýzu boli použité štyri restrikčné endonukleázy *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *TaqI*<sup>a</sup>.

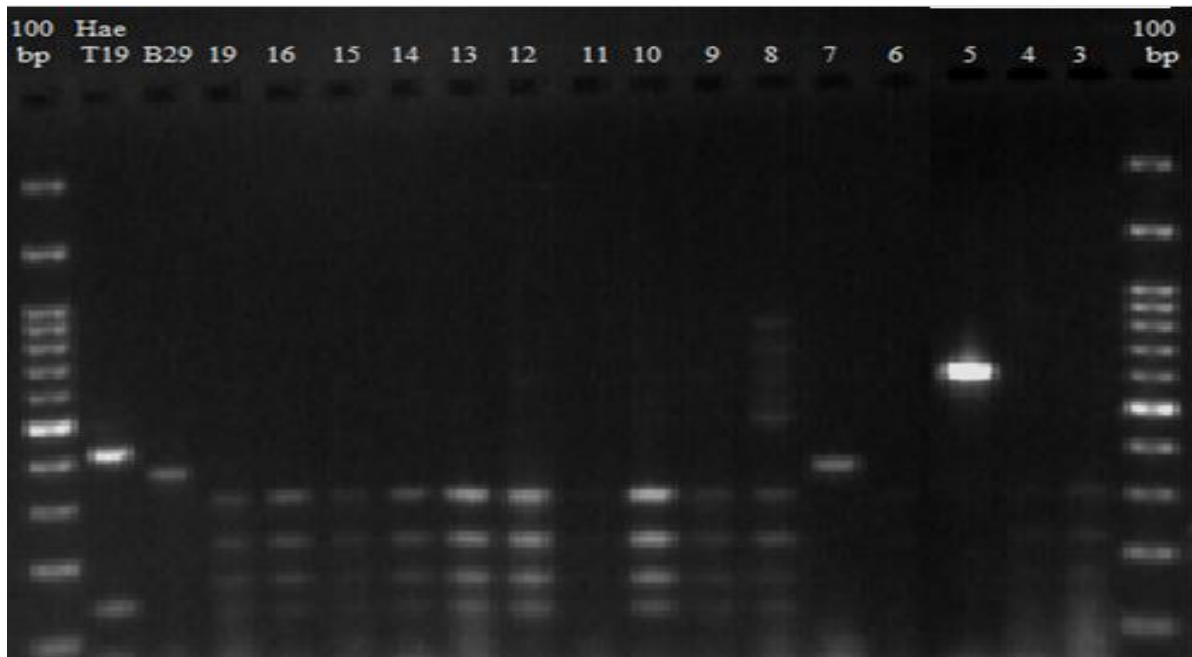
#### 4.1.5 Restrikčná endonukleáza *HaeIII*

Prvou restrikčnou endonukleázou bol enzým *HaeIII*. Zistené veľkosti fragmentov využitím daného enzýmu sú znázornené v tabuľke č. 8. Obrázok č. 12 zobrazuje elektroforeogram vyizolovaných kvasiniek štiepených daným enzýmom.

Pomocou resrikčného enzýmu *HaeIII* boli izolované vzorky kvasiniek rozdelené do troch skupín. Prvou skupinou boli vzorky s veľkosťou PCR produktu 880 bp, ktoré boli rozdelené restrikčným enzýmom na štyri fragmenty o veľkostiach 140 bp, 180 bp, 240 bp a 320 bp. Ďalšou skupinou bola vzorka s veľkosťou PCR produktu 650 bp, ktorý nebol rozdelený restrikčným enzýmom. Treťou skupinou boli vzorky s veľkosťou PCR produktu 380 bp, ktoré neboli rozdelené restrikčným enzýmom.

**Tab. č. 8:** Veľkosti fragmentov štiepených PCR produktov kvasiniek izolovaných z muštu za využitia restrikčného enzýmu *HaeIII*

Pracovné označenie	Odber č.	Veľkosť PCR produktu [bp]	Veľkosť restrikčných fragmentov [bp]
1	4	880	140+180+240+320
3	5	880	140+180+240+320
4	5	880	140+180+240+320
5	1	650	neštiepi
6	2	880	140+180+240+320
7	1	380	neštiepi
8	3	880	140+180+240+320
11	5	880	140+180+240+320
12	5	880	140+180+240+320
13	5	880	140+180+240+320
15	4	880	140+180+240+320
16	4	880	140+180+240+320
17	4	880	140+180+240+320
19	4	880	140+180+240+320
22	2	880	140+180+240+320
23	1	380	neštiepi
24	1	380	neštiepi
25	3	880	140+180+240+320



**Obr. č. 12:** Ukážka elektroforeogramu restričných fragmentov získaných štiepením PCR produktov pomocou restričnej endonukleázy *HaeIII*. 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, čísla 3 – 16, 19 a tiež i B29 s T19 sú pracovné označenia pre jednotlivé vzorky

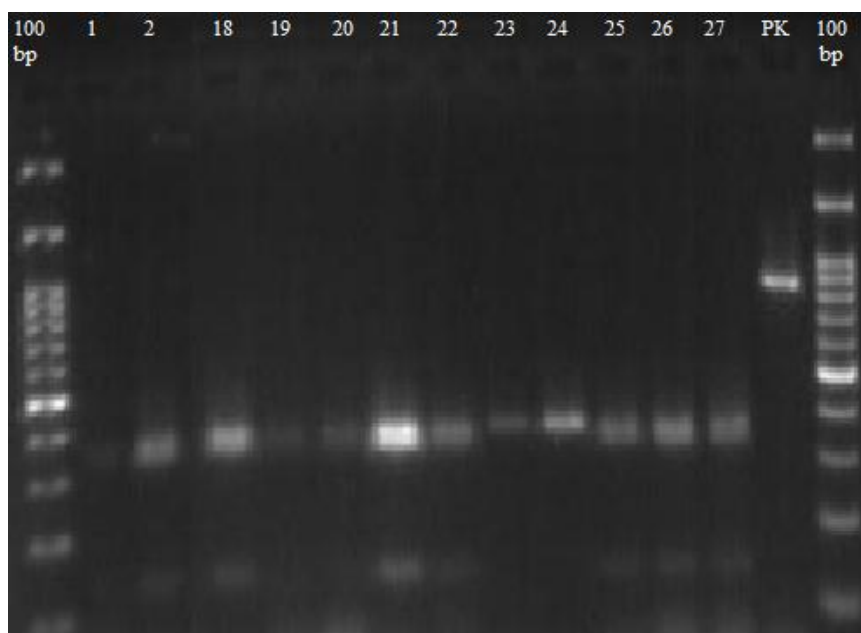
#### 4.1.6 Restričná endonukleáza *HhaI*

Ďalším enzýmom použitým pre restričnú analýzu bol enzým *HhaI*. Zistené veľkosti fragmentov využitím daného enzýmu sú znázornené v tabuľke č. 9. Obrázok č. 13 zobrazuje elektroforeogram vyizolovaných kvasiniek štiepených daným enzýmom.

Izolované kvasinky boli restričným enzýmom *HhaI* rozdelené do troch skupín. Prvou skupinou boli vzorky s veľkosťou PCR produktu 880 bp, ktoré boli rozdelené restričným enzýmom na tri fragmenty o veľkostiach 140 bp, 350 bp a 380 bp. Ďalšou skupinou bola vzorka s veľkosťou PCR produktu 650 bp, ktorá bola rozdelená restričným enzýmom na dva fragmenty s veľkosťou 90 bp a 570 bp. Treťou skupinou boli vzorky s veľkosťou PCR produktu 380 bp, ktoré neboli rozdelené restričným enzýmom.

**Tab. č. 9:** Veľkosti fragmentov štiepených PCR produktov kvasiniek izolovaných z muštu za využitia restriktčného enzýmu *HhaI*

Pracovné označenie	Odber č.	Veľkosť PCR produktu [bp]	Veľkosť restriktčných fragmentov [bp]
1	4	880	140+350+380
3	5	880	140+350+380
4	5	880	140+350+380
5	1	650	90+570
6	2	880	140+350+380
7	1	380	neštiepi
8	3	880	140+350+380
11	5	880	140+350+380
12	5	880	140+350+380
13	5	880	140+350+380
15	4	880	140+350+380
16	4	880	140+350+380
17	4	880	140+350+380
19	4	880	140+350+380
22	2	880	140+350+380
23	1	380	neštiepi
24	1	380	neštiepi
25	3	880	140+350+380



**Obr. č. 13:** Ukážka elektroforeogramu restriktčných fragmentov získaných štiepením PCR produktov pomocou restriktčnej endonukleázy *HhaI*. 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, PK – pozitívna kontrola, čísla 1, 2, 18 – 27 sú pracovné označenia pre jednotlivé vzorky

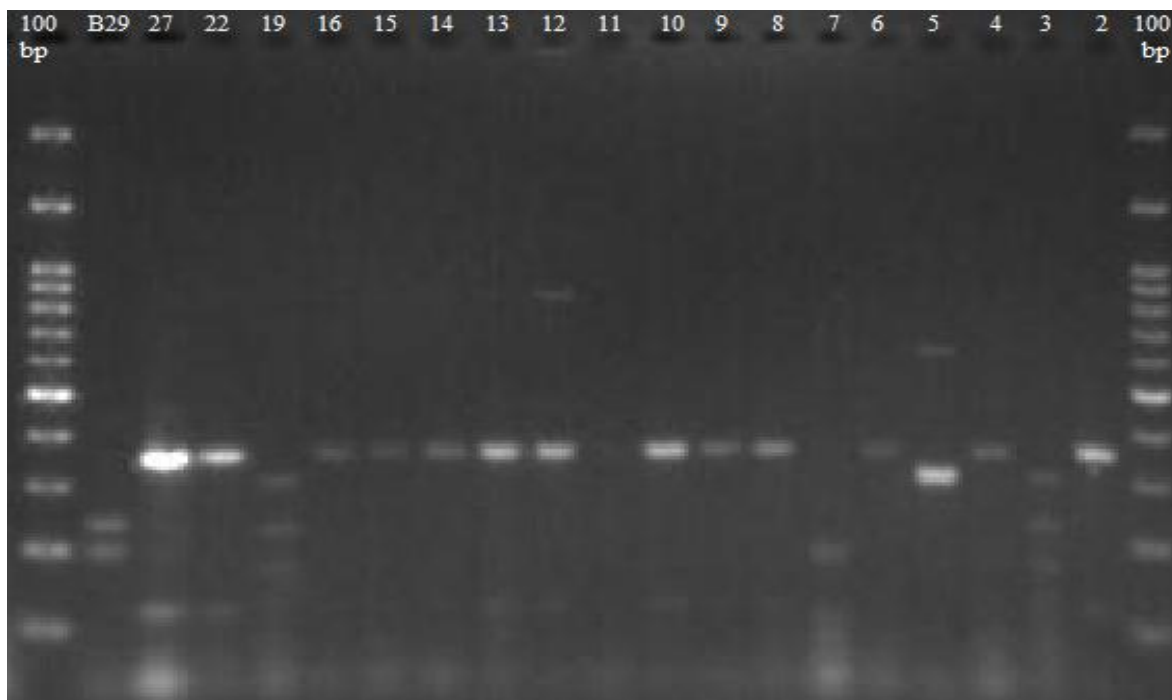
#### 4.1.7 Restričná endonukleáza *Hinf*I

Ďalším enzýmom použitým pre restričnú analýzu bol enzým *Hinf*I. Zistené veľkosti fragmentov využitím daného enzýmu sú znázornené v tabuľke č. 10. Obrázok č. 14 zobrazuje elektroforeogram vyizolovaných kvasiniek štiepených daným enzýmom.

Izolované kvasinky boli restričným enzýmom *Hinf*I rozdelené do troch skupín. Prvou skupinou boli vzorky s veľkosťou PCR produktu 880 bp, ktoré boli rozdelené restričným enzýmom na dva fragmenty o veľkostiach 120 bp a 380 bp. Ďalšou skupinou bola vzorka s veľkosťou PCR produktu 650 bp, ktorá bola rozdelená restričným enzýmom na jeden fragment s veľkosťou 330 bp. Treťou skupinou boli vzorky s veľkosťou PCR produktu 380 bp, ktoré boli rozdelené restričným enzýmom na tri fragmenty o veľkosti 70 bp, 120 bp a 210 bp.

**Tab. č. 10:** Veľkosti fragmentov štiepených PCR produktov kvasiniek izolovaných z muštu za využitia restričného enzýmu *Hinf*I

Pracovné označenie	Odber č.	Veľkosť PCR produktu [bp]	Veľkosť restričných fragmentov [bp]
1	4	880	120+380
3	5	880	120+380
4	5	880	120+380
5	1	650	330
6	2	880	120+380
7	1	380	70+120+210
8	3	880	120+380
11	5	880	120+380
12	5	880	120+380
13	5	880	120+380
15	4	880	120+380
16	4	880	120+380
17	4	880	120+380
19	4	880	120+380
22	2	880	120+380
23	1	380	70+120+210
24	1	380	70+120+210
25	3	880	120+380



**Obr. č. 14:** Ukážka elektroforeogramu restričných fragmentov získaných štiepením PCR produktov pomocou restriktívnej endonukleázy *HinfI*. 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, čísla 2 – 16, 19, 22, 27 a B29 sú pracovné označenia pre jednotlivé vzorky

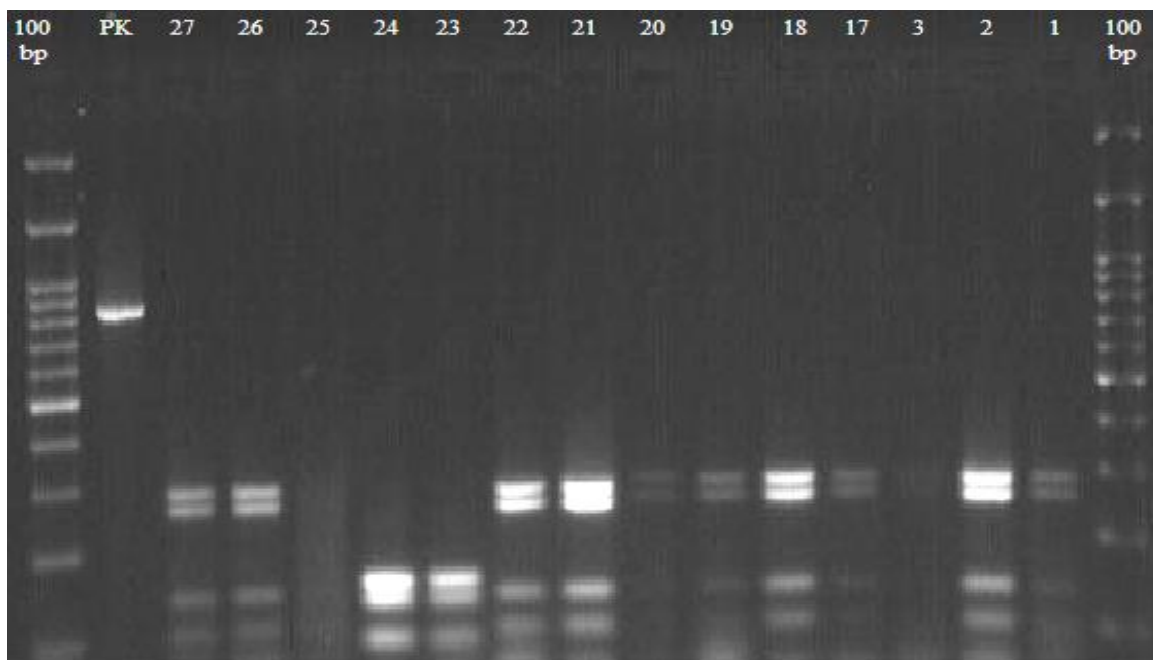
#### 4.1.8 Restričná endonukleáza *TaqI*<sup>o</sup>

Posledným enzýmom použitým pre restričnú analýzu bol enzým *TaqI*<sup>o</sup>. Zistené veľkosti fragmentov využitím daného enzýmu sú znázornené v tabuľke č. 11. Obrázok č. 15 zobrazuje elektroforeogram vyizolovaných kvasiniek štiepených daným enzýmom.

Izolované kvasinky boli restričným enzýmom *TaqI*<sup>o</sup> rozdelené do troch skupín. Prvou skupinou boli vzorky s veľkosťou PCR produktu 880 bp, ktoré boli rozdelené restričným enzýmom na päť fragmentov o veľkostiach 70 bp, 100 bp, 140 bp, 270 bp a 300 bp. Ďalšou skupinou bola vzorka s veľkosťou PCR produktu 650 bp, ktorá bola rozdelená restričným enzýmom na tri fragmenty s veľkosťou 70 bp, 260 bp a 330 bp. Treťou skupinou boli vzorky s veľkosťou PCR produktu 380 bp, ktoré boli rozdelené restričným enzýmom na tri fragmenty o veľkosti 80 bp, 150 bp a 170 bp.

**Tab. č. 11:** Veľkosti fragmentov štiepených PCR produktov kvasiniek izolovaných z muštu za využitia restriktčného enzýmu *TaqI*<sup>a</sup>

Pracovné označenie	Odber č.	Veľkosť PCR produktu [bp]	Veľkosť restriktčných fragmentov [bp]
1	4	880	70+100+140+270+300
3	5	880	70+100+140+270+300
4	5	880	70+100+140+270+300
5	1	650	70+260+330
6	2	880	70+100+140+270+300
7	1	380	80+150+170
8	3	880	70+100+140+270+300
11	5	880	70+100+140+270+300
12	5	880	70+100+140+270+300
13	5	880	70+100+140+270+300
15	4	880	70+100+140+270+300
16	4	880	70+100+140+270+300
17	4	880	70+100+140+270+300
19	4	880	70+100+140+270+300
22	2	880	70+100+140+270+300
23	1	380	80+150+170
24	1	380	80+150+170
25	3	880	70+100+140+270+300



**Obr. č. 15:** Ukážka elektroforeogramu restričných fragmentov získaných štiepením PCR produktov pomocou restriktívnej endonukleázy *TaqI*<sup>o</sup>. 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, PK – pozitívna kontrola, čísla 1, 2, 3, 17 – 27 sú pracovné označenia pre jednotlivé vzorky

#### 4.1.9 Dendrogram kvasiniek izolovaných z vína

Všetky získané elektroforeogramy z restričných analýz boli spracované v programe BioNumerics (kapitola 3.5.8). Daný program na základe UPGMA klastrovej analýzy zostavil dendrogram genetickej podobnosti (obr. č. 16). Cieľom klastrovej analýzy je nájsť v súbore objekty, ktoré sú si podobné a zhromaždiť ich do skupín. Ako kritérium bol zvolený Jaccardov koeficient podobnosti s toleranciou 3 %.

Vytvorený dendrogram rozdelil vyizolované kvasinky do troch základných skupín. Prvou veľkou skupinou sú kvasinky rodu *Saccharomyces*. Druhá skupina a tretia skupina sú tvorené kvasinkami rodu *Pichia*.

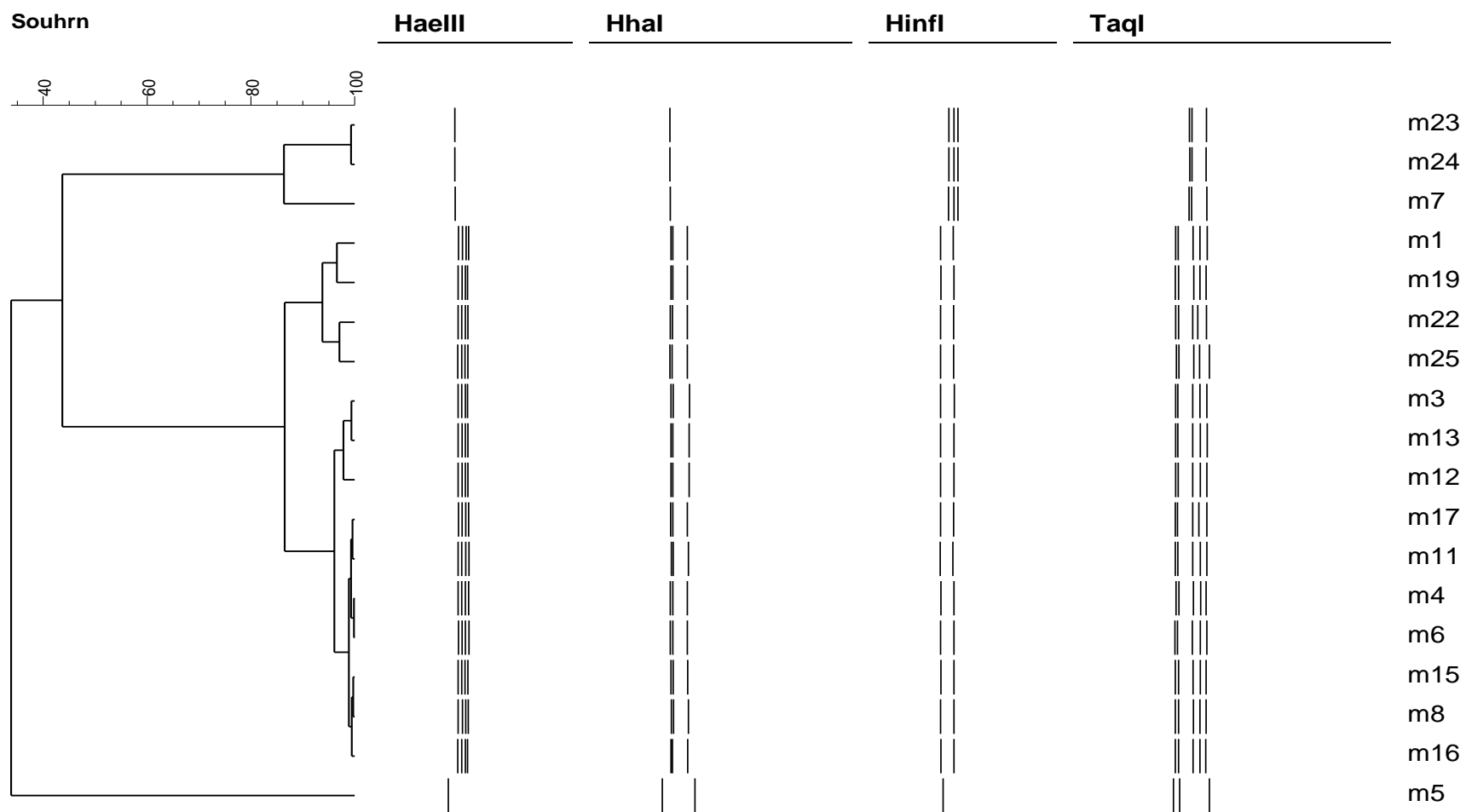
Porovnávaním s databázami i s článkami sa podarilo niektoré vzorky kvasiniek identifikovať i na druhovej úrovni. Pri rode *Saccharomyces* bola pravdepodobne identifikovaná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, ktorou bol samotný mušt i zaočkovaný (kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* bola vyizolovaná minulý rok z bobúľ hrozna pochádzajúcich z vinárstva Štěpán Maňák, Žadovice a tohto roku bol ňou mušt následne zaočkovaný).

Pri vzorkách s číslami 7, 23 a 24 by pravdepodobne mohlo ísť o *Pichiu pastoris*. Poslednú skupinu kvasiniek rodu *Pichia*, ktorá je tvorená vzorkou číslo 5, sa nepodarilo porovnaním s databázami bližšie špecifikovať.

Porovnaním veľkostí PCR produktov s číslom jednotlivého odberu (tab. č. 12) bolo zistené, že od druhého odberu vzorky muštu (HIB-1 – po zaočkovaní kvasinkou) už nedochádzalo k výskytu rodu *Pichia* v mušte a prejavilo sa dominantné postavenie rodu *Saccharomyces*.

**Tab. č. 12:** Zmeny vo veľkosti PCR produktu v rámci odberu kvasiniek z muštu

<b>Pracovné označenie</b>	<b>Odber č.</b>	<b>Veľkosť PCR produktu [bp]</b>
5	1	650
7	1	380
23	1	380
24	1	380
6	2	880
22	2	880
8	3	880
25	3	880
1	4	880
15	4	880
16	4	880
17	4	880
19	4	880
3	5	880
4	5	880
11	5	880
12	5	880
13	5	880



**Obr. č. 16:** Dendrogram genetickej podobnosti kvasiniek izolovaných z muštu zostavený na základe výsledku restriktčnej analýzy.

## 4.2 Identifikácia zbierkových kvasiniek

Diplomová práca pokračovala rozšírením databázy o zbierkové kvasinky dodané z CCY (Chemický ústav, Bratislava, Slovensko). Na experiment bolo použitých celkovo 10 kvasiniek a ich zoznam je uvedený v kapitole 3.1. Dané kvasinky boli podrobené PCR a následne restriktívnej analýze s využitím enzýmov *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *TaqI*<sup>a</sup>.

### 4.2.1 Kultivácia zbierkových kvasiniek

Kvasinky boli naočkované na Petriho misky so sladínovým agarom a inkubované v termostate pri teplote 26 °C počas troch dní. Po kultivácii bola z kvasiniek izolovaná DNA.

### 4.2.2 Izolácia DNA

Izolácia kvasinkovej DNA prebiehala využitím komerčného setu ULTRA CLEAN<sup>TM</sup> Microbial DNA Isolation Kit (kapitola 3.5.3). Vyizolovaná DNA pre ďalšie použitie bola uložená v mrazničke pri teplote – 20°C.

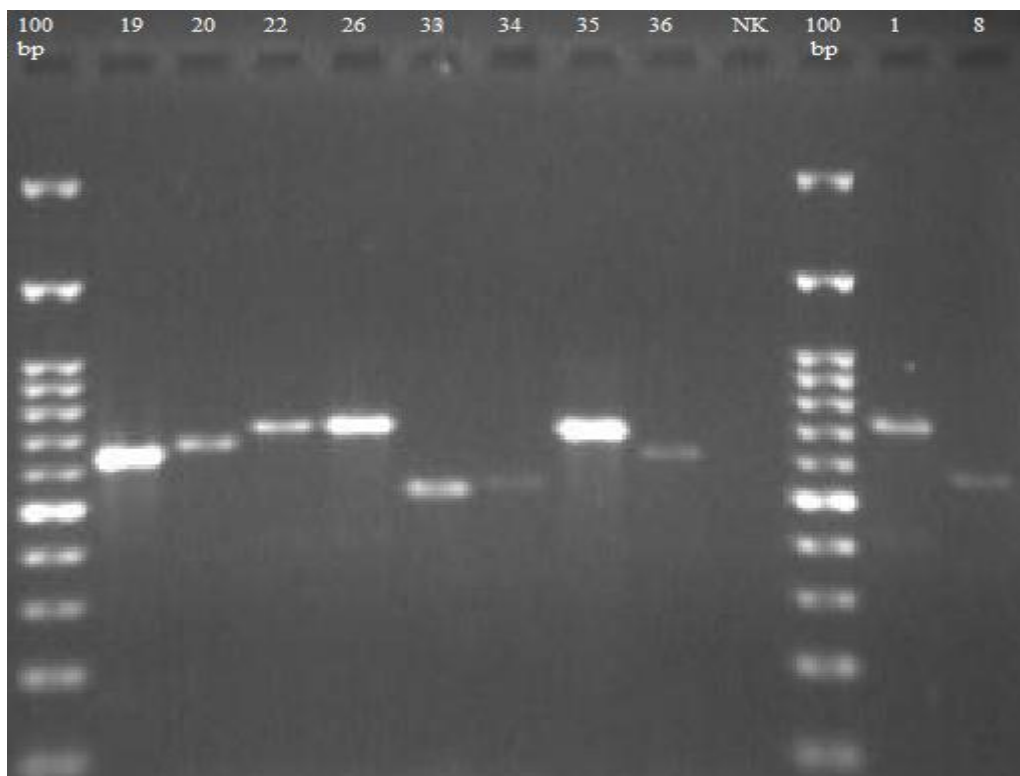
### 4.2.3 Amplifikácia izolovanej DNA

Izolovaná DNA z čistých kvasinkových kultúr zbierkových kvasiniek bola amplifikovaná pomocou PCR (kapitola 3.5.4). PCR produkty boli detekované elektroforézou na 2 % agarózovom géle. Veľkosti jednotlivých fragmentov sú zhrnuté v tabuľke č. 13. Obrázok č. 17 zobrazuje elektroforeogram PCR produktov izolovaných kvasiniek.

Pri rode *Kluyveromyces* bola veľkosť PCR produktu 740 bp. Rod *Debaryomyces* mal veľkosť fragmentov 660 bp. Pri rode *Candida* bola veľkosť PCR produktu 640 bp a 700 bp. Rod *Pichia* mal veľkosť PCR produktu 560 bp a rod *Bulleromyces* 550 bp. Rod *Cryptococcus* mal veľkosť PCR produktu 540 bp.

**Tab. č. 13:** Veľkosti fragmentov PCR produktov izolovaných zbierkových kvasiniek

Názov kvasinky	Pracovné označenie	Číslo v CCY	Veľkosť PCR produktu [bp]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	013-003-001	740
<i>Pichia jadinii</i>	8	029-038-079	560
<i>Debaryomyces hansenii</i>	19	041-006-009	660
<i>Debaryomyces hansenii</i>	20	041-006-012	660
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	22	050-002-002	740
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	26	051-001-011	740
<i>Cryptococcus sp.</i>	33	2L3 Pernek	540
<i>Bulleromyces albus</i>	34	012-001-010	550
<i>Candida boidinii</i>	35	029-056-001	700
<i>Candida oleophila</i>	36	029-175-003	640



**Obr. č. 17:** Ukážka elektroforeogramu PCR produktov izolovaných zbierkových kvasiniek, 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, NK – negatívna kontrola, čísla 1, 8, 19, 20, 22, 26, 33, 34, 35 a 36 sú pracovné označenia jednotlivých vzoriek

#### 4.2.4 Restrikčná analýza

Kvôli presnejšiemu taxonomickému zaradeniu boli naamplifikované úseky DNA jednotlivých izolovaných kvasiniek podrobené restrikčnej analýze (kapitola 3.5.6). Samotnej restrikčnej analýze predchádzalo prečistenie PCR produktu (kapitola 3.5.5). Pre restrikčnú analýzu boli použité štyri restrikčné endonukleázy *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *TaqI*<sup>a</sup>.

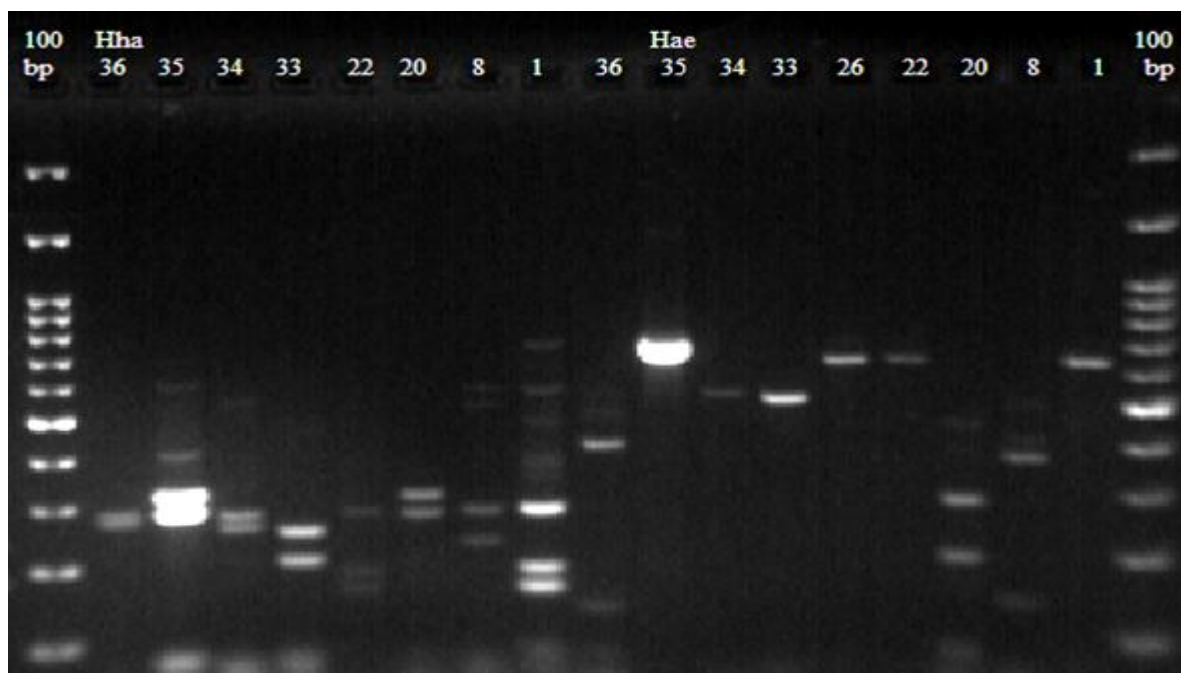
#### 4.2.5 Restrikčná endonukleáza *HaeIII*

Prvou restrikčnou endonukleázou bol enzým *HaeIII*. Zistené veľkosti fragmentov využitím daného enzýmu sú znázornené v tabuľke č. 14. Obrázok č. 17 zobrazuje elektroforeogram vyizolovaných kvasiniek štiepených daným enzýmom.

Pomocou restrikčného enzýmu *HaeIII* boli izolované vzorky zbierkových kvasiniek rozdelené do niekoľkých skupín. Prvou skupinou bol rod *Kluyveromyces*, ktorý bol rozdelený restrikčným enzýmom na jeden fragment. Rody *Cryptococcus*, *Bulleromyces* a tiež i *Candida boidinii* neboli štiepené enzýmom *HaeIII*. Ostatné zbierkové kvasinky boli štiepené na dva, tri až štyri fragmenty.

**Tab. č. 14:** Veľkosti fragmentov štiepených PCR produktov zbierkových kvasiniek za využitia restriktčného enzýmu *HaeIII*

Názov kvasinky	Pracovné označenie	Veľkosť PCR produktu [bp]	Veľkosť restriktčných fragmentov [bp]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	740	660
<i>Pichia jadinii</i>	8	560	150+390
<i>Debaryomyces hansenii</i>	19	660	90+150+420
<i>Debaryomyces hansenii</i>	20	660	60+90+210+300
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	22	740	660
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	26	740	660
<i>Cryptococcus sp.</i>	33	540	neštiepi
<i>Bulleromyces albus</i>	34	550	neštiepi
<i>Candida boidinii</i>	35	700	neštiepi
<i>Candida oleophila</i>	36	640	90+140+420



**Obr. č. 18:** Ukážka elektroforeogramu restriktčných fragmentov získaných štiepením PCR produktov pomocou restriktčnej endonukleázy *HaeIII*. 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, čísla 1, 8, 20, 22, 26, 33, 34, 35 a 36 sú pracovné označenia pre jednotlivé vzorky

#### 4.2.6 Restriktčná endonukleáza *HhaI*

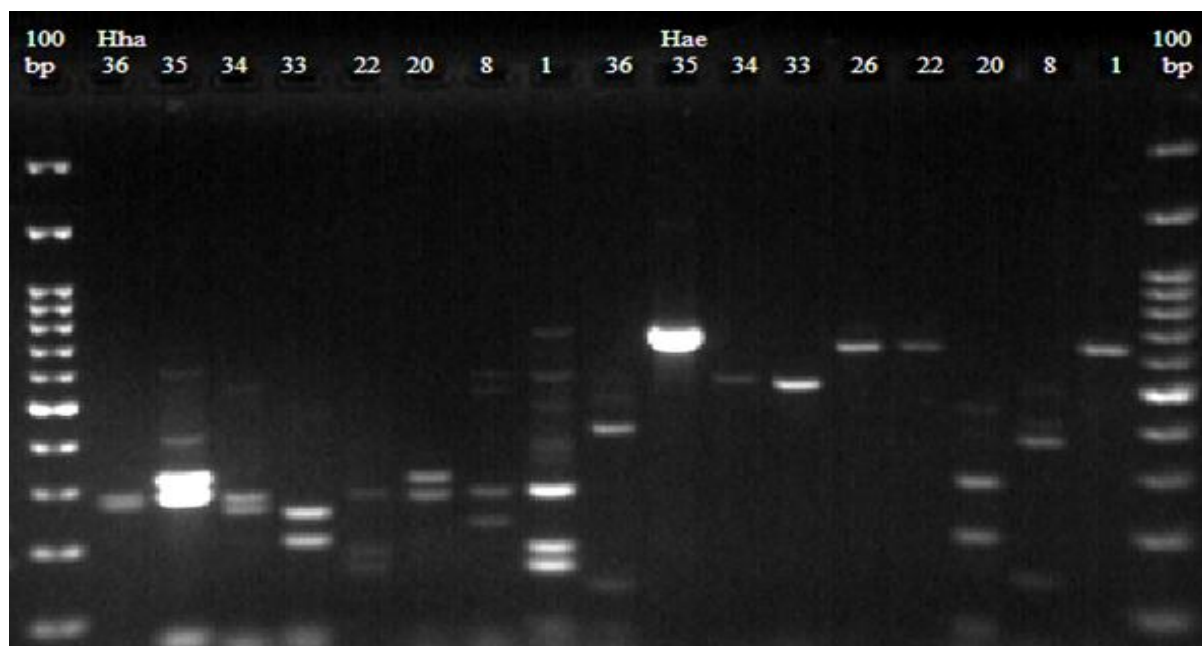
Ďalším enzýmom použitým pre restriktčnú analýzu bol enzým *HhaI*. Zistené veľkosti fragmentov využitím daného enzýmu sú znázornené v tabuľke č. 15. Obrázok č. 18 zobrazuje elektroforeogram vyizolovaných kvasiniek štiepených daným enzýmom.

Pomocou restriktčného enzýmu *HhaI* boli izolované vzorky zbierkových kvasiniek rozdelené do niekoľkých skupín. Prvou skupinou bol rod *Kluyveromyces*, ktorý bol rozdelený

restrikčným enzýmom na štyri fragmenty. Pri rode *Candida* došlo k rozdeleniu fragmentov nasledovne – *Candida boidinii* tri fragmenty a *Candida oleophila* mala okrem jedného dvojitého fragmentu ešte ďalší fragment. Ostatné zbierkové kvasinky boli štiepené na dva a tri fragmenty.

**Tab. č. 15:** Veľkosti fragmentov štiepených PCR produktov zbierkových kvasiniek za využitia restrikčného enzýmu *HhaI*

Názov kvasinky	Pracovné označenie	Veľkosť PCR produktu [bp]	Veľkosť restrikčných fragmentov [bp]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	740	90+170+190+290
<i>Pichia jadinii</i>	8	560	250+300
<i>Debaryomyces hansenii</i>	19	660	300+330
<i>Debaryomyces hansenii</i>	20	660	300+330
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	22	740	90+170+190+290
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	26	740	90+170+190+290
<i>Cryptococcus sp.</i>	33	540	80+210+250
<i>Bulleromyces albus</i>	34	550	270+280
<i>Candida boidinii</i>	35	700	90+290+320
<i>Candida oleophila</i>	36	640	60+290



**Obr. č. 19:** Ukážka elektroforeogramu restrikčných fragmentov získaných štiepením PCR produktov pomocou restrikčnej endonukleázy *HhaI*. 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, čísla 1, 8, 20, 22, 33, 34, 35 a 36 sú pracovné označenia pre jednotlivé vzorky

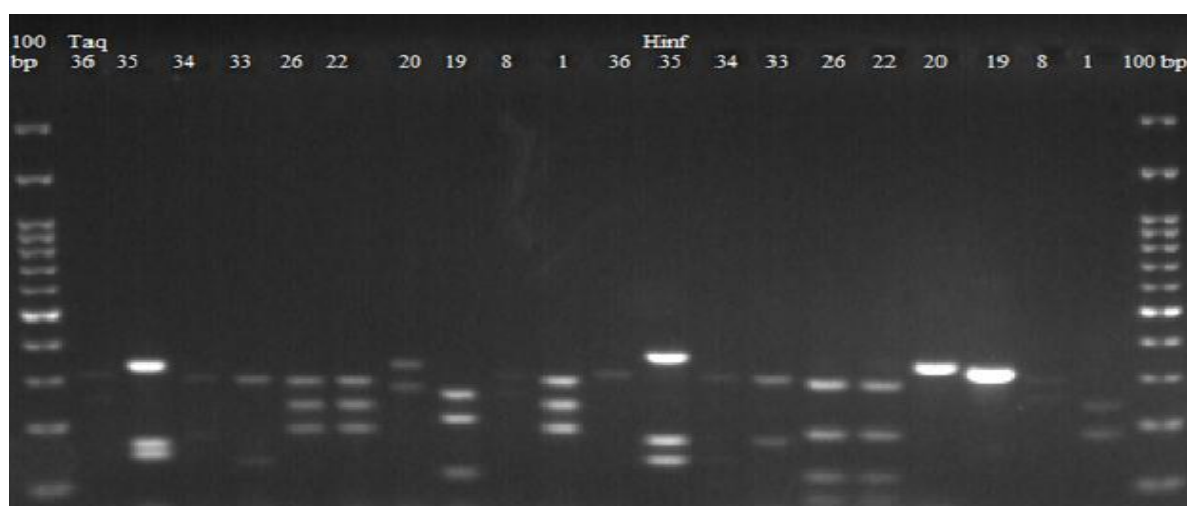
#### 4.2.7 Restričná endonukleáza *Hinf*I

Ďalším enzýmom použitým pre restričnú analýzu bol enzým *Hinf*I. Zistené veľkosti fragmentov využitím daného enzýmu sú znázornené v tabuľke č. 16. Obrázok č. 19 zobrazuje elektroforeogram vyizolovaných kvasiniek štiepených daným enzýmom.

Pomocou restričného enzýmu *Hinf*I boli izolované vzorky zbierkových kvasiniek rozdelené do niekoľkých skupín. Prvou skupinou bol *Kluyveromyces lactis*, ktorý bol rozdelený restričným enzýmom na štyri fragmenty, do tejto skupiny patrila i *Candida boidinii*. Rody *Bulleromyces* a *Cryptococcus* mali tri fragmenty. Rod *Debaryomyces* a tiež i *Candida oleophila* boli štiepené na jeden fragment. Zvyšné kvasinky boli štiepené na dva a päť fragmentov.

**Tab. č. 16:** Veľkosti fragmentov štiepených PCR produktov zbierkových kvasiniek za využitia restričného enzýmu *Hinf*I

Názov kvasinky	Pracovné označenie	Veľkosť PCR produktu [bp]	Veľkosť restričných fragmentov [bp]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	740	80+120+180+240
<i>Pichia jadinii</i>	8	560	260+300
<i>Debaryomyces hansenii</i>	19	660	330
<i>Debaryomyces hansenii</i>	20	660	330
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	22	740	70+80+120+180+290
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	26	740	70+80+120+180+290
<i>Cryptococcus sp.</i>	33	540	70+170+300
<i>Bulleromyces albus</i>	34	550	70+180+300
<i>Candida boidinii</i>	35	700	50+130+170+350
<i>Candida oleophila</i>	36	640	320



**Obr. č. 20:** Ukážka elektroforeogramu restričných fragmentov získaných štiepením PCR produktov pomocou restričnej endonukleázy *Hinf*I. 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, čísla 1, 8, 19, 20, 22, 26, 33, 34, 35 a 36 sú pracovné označenia pre jednotlivé vzorky

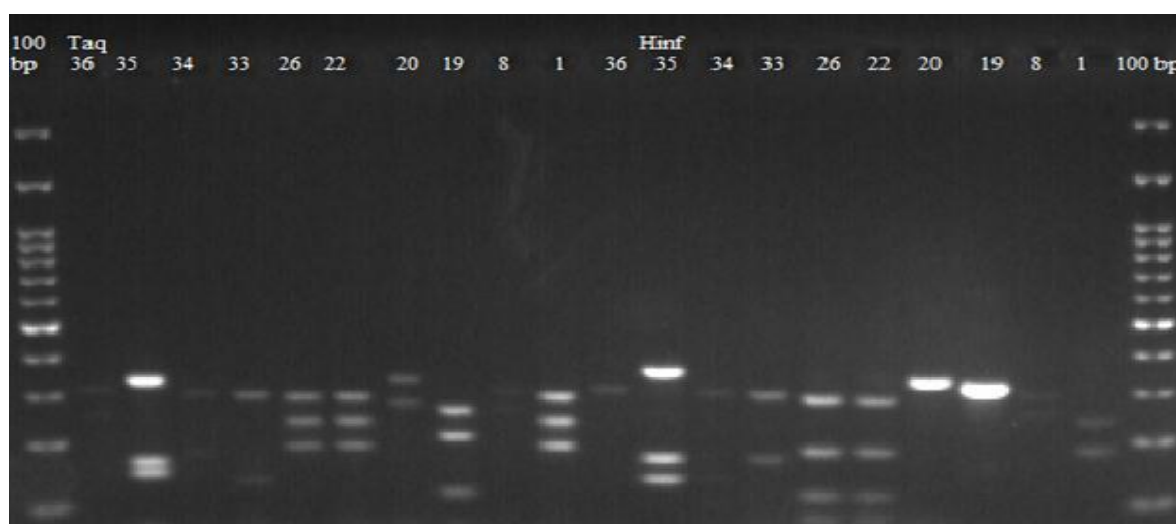
#### 4.2.8 Restričná endonukleáza *TaqI*<sup>a</sup>

Posledným enzýmom použitým pre restričnú analýzu bol enzým *TaqI*<sup>a</sup>. Zistené veľkosti fragmentov využitím daného enzýmu sú znázornené v tabuľke č. 17. Obrázok č. 20 zobrazuje elektroforeogram vyizolovaných kvasiniek štiepených daným enzýmom.

Pomocou restričného enzýmu *TaqI*<sup>a</sup> boli izolované vzorky zbierkových kvasiniek rozdelené do troch skupín. V prvej skupine boli kvasinky rozdelené restričným enzýmom na tri fragmenty, v druhej skupine bola kvasinka *Pichia jadinii* rozdelená enzýmom na dva fragmenty a v poslednej skupine boli vzorka č. 19 - *Debaryomyces hansenii* a *Candida boidinii*, ktoré boli štiepené na štyri fragmenty.

**Tab. č. 17:** Veľkosti fragmentov štiepených PCR produktov zbierkových kvasiniek získaných využitím restričného enzýmu *TaqI*<sup>a</sup>

Názov kvasinky	Pracovné označenie	Veľkosť PCR produktu [bp]	Veľkosť restričných fragmentov [bp]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1	740	200+240+300
<i>Pichia jadinii</i>	8	560	260+300
<i>Debaryomyces hansenii</i>	19	660	70+120+210+260
<i>Debaryomyces hansenii</i>	20	660	60+270+330
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	22	740	200+240+300
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	26	740	200+240+300
<i>Cryptococcus sp.</i>	33	540	70+150+320
<i>Bulleromyces albus</i>	34	550	70+180+300
<i>Candida boidinii</i>	35	700	70+140+160+330
<i>Candida oleophila</i>	36	640	70+260+310

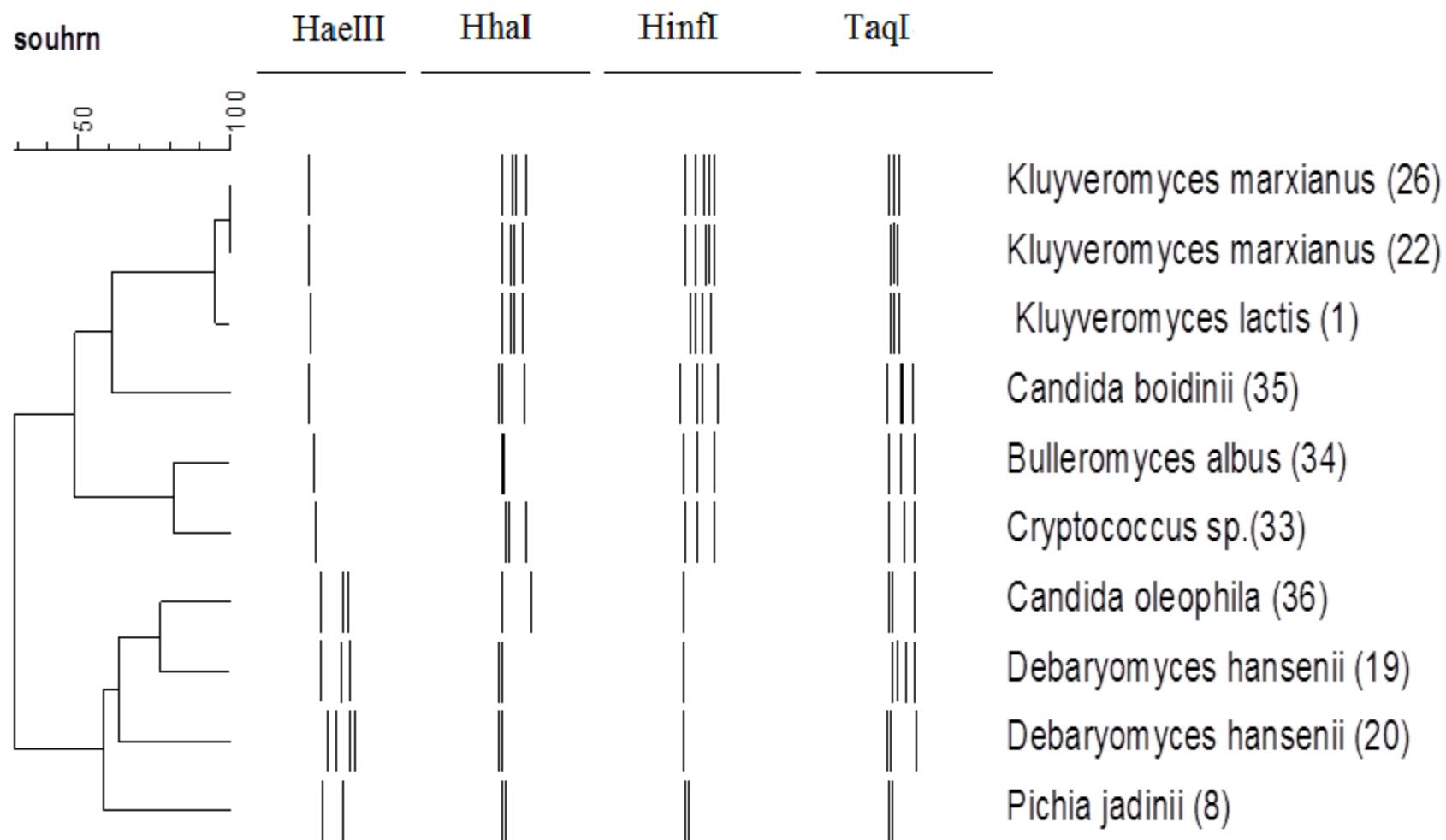


**Obr. č. 21:** Ukážka elektroforeogramu restričných fragmentov získaných štiepením PCR produktov pomocou restričnej endonukleázy *TaqI*<sup>a</sup>. 100 bp – dĺžkový štandard 100 bp, čísla 1, 8, 19, 20, 22, 26, 33, 34, 35 a 36 sú pracovné označenia pre jednotlivé vzorky

#### **4.2.9 Dendrogram zbierkových kvasiniek**

Všetky získané elektroforeogramy z restrikčných analýz boli spracované v programe BioNumerics (kapitola 3.5.8). Daný program na základe UPGMA klastrovej analýzy zostavil dendrogram genetickej podobnosti (obr. č. 22). Cieľom klastrovej analýzy je nájsť v súbore objekty, ktoré sú si podobné a zhromaždiť ich do skupín. Ako kritérium bol zvolený Jaccardov koeficient podobnosti s toleranciou 3 %.

Získané výsledky boli pridané do databázy a budú následne slúžiť pre taxonomické zaradenia kvasiniek v budúcich výskumoch.



**Obr. č. 22:** Dendrogram genetickej podobnosti zbierkových kvasiniek zostavený na základe výsledku restriktívnej analýzy

## 5 ZÁVER

Diplomová práca bola rozdelená na teoretickú a experimentálnu časť. Teoretická časť sa zaoberala tromi oblasťami a to vínom, kvasinkami a metódami molekulárnej biológie.

Pri víne bolo podrobnejšie popísané pestovanie révy vinnej, chemické zloženie a morfológia hrozna, vyrábanie vína, jeho zrenie i ošetrovanie.

Druhá časť teórie sa zaoberala cytológiou, rozmnožovaním a výskytom kvasiniek. Taktiež bolo popísané i chemické zloženie bunkovej hmoty kvasiniek.

Posledná časť teórie bola zameraná na popísanie metód, ktoré boli v experimentálnej časti použité. Konkrétne sa jednalo o PCR a jej modifikáciu RFLP-PCR, následne elektroforézu a vizualizáciu gélu.

Samotná experimentálna časť diplomovej práce bola rozdelená na identifikáciu kvasiniek z muštu odrody Hibernál a na rozšírenie databázy o zbierkové kvasinky.

Mušť odrody Hibernál pochádzal z Vinárstva Štěpán Maňák, Žadovice a bol odoberaný v období október až november 2015. Pomocou PCR, RFLP-PCR, elektroforézy a následného využitia programu BioNumerics boli v mušte identifikované kvasinky rodu *Saccharomyces* a *Pichia*. Pri *Saccharomyces* bola s najväčšou pravdepodobnosťou identifikovaná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, ktorou bol mušť i zaočkovaný. Pri rode *Pichia* sa pravdepodobne jednalo o *Pichia pastoris*. Vzorku číslo 5, kde bola dokázaná prítomnosť kvasiniek rodu *Pichia*, sa nepodarilo bližšie špecifikovať. Kvasinky *Pichia* boli v mušte prítomné iba do prvého odberu, následne sa už v mušte neobjavili, prejavila sa dominantnosť kvasinky *Saccharomyces*.

Experimentálna časť diplomovej práce pokračovala rozšírením databázy o zbierkové kvasinky, ktoré pochádzali zo zbierky mikroorganizmov CCY – Culture Collection of Yeasts, Chemický ústav, Bratislava, Slovensko. Získané veľkosti fragmentov boli doplnené do databázy kvasiniek a budú následne slúžiť k identifikácii kvasiniek pre ďalšie štúdia.

## 6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] KADLEC, P., et al. *Technologie potravín – Přehled tradičních potravinářských výrob.* Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [2] PAVLOUŠEK, P., BUREŠOVÁ, P. *Vše co byste měli vědět o víně a nemáte se koho zeptat.* Praha: Grada Publishing, 2015, 144 s. ISBN 978-80-247-4351-6.
- [3] PAVLOUŠEK, P. *Pěstujeme stolní odrůdy révy vinné.* Praha: Grada Publishing, 2009, 120 s. ISBN 978-80-247-2787-5.
- [4] DRDÁK, M., et al. *Základy potravinářských technologií.* Bratislava: Malé centrum, 1996, 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [5] KUTTELVAŠER, Z. *Abeceda vína.* 2. vyd. Praha: Radic, 2003, 279 s. ISBN 80-86031-43-8.
- [6] KADLEC, P., et al. *Co byste měli vědět o výrobě potravín?* Ostrava: KEY Publishing, 2009, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [7] KRAUS, V., et al. *Rukověť vináře.* 3. vyd. Praha: Brázda, 2010, 267 s. ISBN 978-80-209-0378-5.
- [8] RIBÉREAU-GAYON, P., et al. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications.* 2. vyd. John Wiley & Sons, 2006, 481 s. ISBN 0-470-01034-7.
- [9] PAVLOUŠEK, P. *Výroba vína u malovinařů.* 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010, 128 s. ISBN 978-80-247-3487-3.
- [10] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology.* Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6;
- [11] HRSTKA, M. *Obecná biologie.* Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2005, 112 s. ISBN 80-214-3057-5.
- [12] HUDECOVÁ, L., MAJTÁN, V. *Mikrobiológia I.* Bratislava: STU, 2002, 363 s. ISBN 80-227-1663-4.
- [13] VRANÁ, D., et al. *Kvasinky ve výzkumu a praxi.* Praha: Academia, 1986, 376 s.
- [14] GRAEME, WALKER, M. *Yeast physiology and biotechnology.* John Wiley & Sons, 1998, 321 s. ISBN: 978-0-471-96446-9. Dostupné z: <<https://books.google.sk/books>>.

- [15] HUANG, CH., et al. *A novel specific DNA marker in Saccharomyces bayanus for species identification of the Saccharomyces sensu stricto complex*. Journal of Microbiological Methods [online]. 2008, roč. 75, č. 3, s. 531-534 [cit. 2016-01-30]. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701208003059?np=y>>.
- [16] OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R. *Základy biologie a genetiky člověka*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2012, 226 s. ISBN 978-80-246-2109-8.
- [17] QUEROL, A., GRAHAM, F. *Yeast in Food and Beverages*. Berlin: Springer, 2006, 453 s. ISBN 978-354-0283-881.
- [18] PAULÍK, M., et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 2011, 84 s. ISBN 978-80-247-3533-7.
- [19] OTOVÁ, B., MIHALOVÁ, R. *Základy biologie a genetiky člověka*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2012, 219 s. ISBN 978-80-246-2109-8.
- [20] BROWN, T. A. *Klonování genů a analýza DNA*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 389 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [21] GÁBOR, M., et al. *Prehľad molekulárno-genetických metód používaných pri detekcii DNA polymorfizmu*. [online]. s. 1-8 [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: <<http://kgpb.fapz.uniag.sk/subory/molgen1.pdf>>.
- [22] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 978-80-86369-07-5.
- [23] VESELÁ, M., DRDÁK, M. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. vyd. Brno: VUT v Brně, 1999, 87 s. ISBN 80-214-1305-0.
- [24] ŠURANSKÁ, H. *Identifikace vinných kvasinek metodou PCR-RFLP*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009, 100 s.
- [25] MELOUN, M., MILITIKÝ, J. *Statistická analýza experimentálních dat*. 2. vyd. Praha: ACADEMIA, 2004, 953 s. ISBN 80-200-1254-0.
- [26] RITTICH, B., et al. *Molekulární identifikace a typizace bakterií mléčného kvašení s využitím shlukové analýzy*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2014, 79 s. ISBN 978-80-214-4853-7.
- [27] BELLOCH, C., et al. *Identification of species in the genus Pichia by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene*.

Identification of *Pichia* species by 5.8S-ITS rDNA RFLP. Antonie van Leeuwenhoek [online]. 2006, vol. 90, s. 171-181 [cit. 2016-03-26]. Dostupné z: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10482-006-9071-0#/page-1>>.

[28] ESTEVE-ZARZOSO, B., et al. *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. Journal of Systematic Bacteriology [online]. 1999, vol. 49, s. 329-337 [cit. 2016-03-25]. Dostupné z: <<http://www.microbiologyresearch.org/docserver>>.

## **7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY K OBRÁZKOM**

[29] Schéma gélovej elektroforézy [online]. [cit. 2016-01-30]. Dostupný z WWW:  
< [http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-gelova\\_elektroforeza&lang=cz](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz)>

[30] Vyhodnotenie PCR reakcie za použitia etídium bromidu [online]. [cit. 2016-01-30].  
Dostupný z WWW:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822013000500625&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822013000500625&script=sci_arttext)>

## **8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV**

bp – počet párov báz

kb – kilobase (počet párov báz v tisícoch)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

% – percento

PCR – polymerázová reťazová reakcia

PCR – RFLP – polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov

μl – mikroliter

dNTP – deoxynukleotidtrifosfát

ITS – internal transcribed spacer (vnútorne prepisovaný medzerník/oblasť)

Tris – Tris(hydroxymetyl)aminometán

EDTA – etyléndiamintetraoctová kyselina

TBE – Trisborát EDTA pufor

NaOH – hydroxid sodný

UV – ultrafialové žiarenie

ENR – endoplazmatické retikulum

## 9 PRÍLOHY

Príloha č. 1: Odber vzoriek hrozna z vinice



Príloha č. 2: Očkovanie vzorky na médium a následný rozter sterilnou hokejkou

