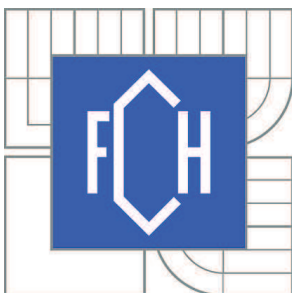


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VÝBĚR VHODNÝCH AUTOCHTONNÍCH KVASINEK PRO VÝROBU VÍNA

SELECTION OF APPROPRIATE INDIGENOUS YEASTS FOR WINE PRODUCTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

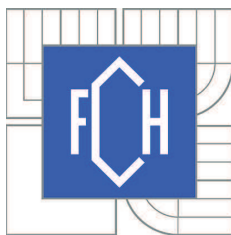
Bc. VERONIKA KRÁTKÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2014



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0828/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Veronika Krátká	
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:

Výběr vhodných autochtonních kvasinek pro výrobu vína

Zadání diplomové práce:

1. Literární přehled na zadané téma
2. Izolace autochtonních kvasinek z prostředí vinice
3. Výběr vhodných metod pro testování oenologických vlastností izolovaných kvasinek
4. Zpracování výsledků a jejich zhodnocení

Termín odevzdání diplomové práce: 9.5.2014

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. Veronika Krátká
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce byl výběr vhodných autochtonních kvasinek pro výrobu vína. Testované kvasinky byly izolovány z hroznů, které poskytlo vinařství Maňák Žádovice. Dále byly testovány kvasinky, izolované v rámci diplomových prací z let 2009 – 2012, a pro srovnání jedna komerční kvasinka.

V teoretické části je kladen důraz na technologii výroby vína, zejména na kvašení. Dále je práce zaměřena na kvasinky, jejich metabolismus a taxonomii. Byl popsán princip metody PCR-RFLP, a princip metod využitých pro charakterizaci vlastností kvasinek.

V rámci experimentální části byla provedena izolace kvasinek, jejich identifikace pomocí RFLP-PCR a byly provedeny fyziologické testy pro výběr nejvhodnější kvasinky do procesu výroby vína.

ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was the selection of appropriate indigenous yeasts for wine production. Tested yeasts were isolated from the grapes from the winery Maňák Žádovice. The yeasts isolated within theses in 2009 – 2012 have been also tested, and commercial wine yeast have been tested for comparison.

In the theoretical part the focus is on the technology of wine, in particular fermentation. The work is also focused on yeasts metabolism and taxonomy. There was described the principle of PCR-RFLP, and methods used to characterize the properties of isolated yeasts.

In the experimental part was made isolation of yeasts, their identification using PCR-RFLP and to select the most suitable yeast in wine making process were performed physiological tests.

KLÍČOVÁ SLOVA

Terroir, kvasinky, RFLP-PCR, fermentace

KEY WORDS

Terroir, yeasts, RFLP-PCR, fermentation

KRÁTKÁ, V. *Výběr vhodných autochtonních kvasinek pro výrobu vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. XY s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

*Ráda bych poděkovala Mgr. Daně Vránové, Ph.D.
za odborné vedení a všestrannou pomoc
při realizaci této diplomové práce.*

OBSAH

1	ÚVOD	12
2	TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1	Réva vinná	13
2.1.1	Morfologie hroznu	13
2.1.1.1	Třapina	13
2.1.1.2	Bobule	13
2.1.2	Chemické složení hroznu	14
2.1.2.1	Voda	14
2.1.2.2	Cukry	14
2.1.2.3	Organické kyseliny	15
2.1.2.4	Dusíkaté látky	15
2.1.2.5	Minerální látky	16
2.1.2.6	Aromatické látky	16
2.1.2.7	Fenolické látky	16
2.1.3	Odrůdy révy vinné	16
2.2	Kvalita vína a vinařská legislativa	17
2.3	Technologie výroby bílého vína	18
2.3.1	Skližeň hroznů	18
2.3.2	Příjem a zpracování hroznů	19
2.3.3	Příprava rmutu	19
2.3.4	Příprava moštu	19
2.3.5	Úpravy moštu	20
2.3.5.1	Odkalování moštů	20
2.3.5.2	Úprava cukernatosti	20
2.3.5.3	Úprava kyselosti moštů	21
2.3.5.4	Síření moštů	21
2.3.5.5	Provzdušňování moštů	21
2.3.6	Alkoholové kvašení	22
2.3.6.1	Spontánní kvašení	23
2.3.6.2	Kvašení pomocí čistých kultur kvasinek	23
2.3.7	Kvašení pomocí autochtonních kvasinek	24
2.3.7.1	Faktory ovlivňující alkoholové kvašení	25

2.3.8	Biologické odbourávání kyselin	26
2.3.9	Školení vína	27
2.3.9.1	Čiření vína	27
2.3.9.2	Filtrace vína	27
2.3.10	Lahvování vína	27
2.4	Kvasinky	28
2.4.1	Morfologie	28
2.4.2	Cytologie	28
2.4.2.1	Buněčná stěna	29
2.4.2.2	Cytoplazmatická membrána	29
2.4.2.3	Cytoplazma	29
2.4.2.4	Jádro	29
2.4.3	Chemické složení kvasinkové buňky	30
2.4.4	Rozmnožování kvasinek	31
2.4.4.1	Nepohlavní rozmnožování	31
2.4.4.2	Pohlavní rozmnožování	33
2.4.5	Růstová křivka kvasinek	34
2.4.6	Metabolismus kvasinek	35
2.4.6.1	Ethanolové kvašení	35
2.4.6.2	Glycerolpyruvátová fermentace	37
2.4.7	Taxonomie kvasinek	37
2.4.7.1	Třída <i>Ascomycetes</i>	37
2.4.7.2	Třída <i>Basidiomycetes</i>	38
2.4.8	Rod <i>Saccharomyces</i>	38
2.4.9	Vinařské kvasinky	39
2.4.9.1	Křísotvorné kvasinky	40
2.4.9.2	Apikulátní kvasinky	40
2.4.9.3	Ušlechtilé kvasinky	41
2.5	Identifikace a charakterizace kvasinek	41
2.5.1	Tolerance vůči alkoholu	42
2.5.2	Osmotolerance	42
2.5.3	Důkaz ureázy	42
2.5.4	Zkvašování sacharidů	42

2.5.5	Důkaz killerové aktivity	43
2.5.6	Identifikace metodami molekulární biologie	43
2.5.6.1	PCR.....	43
2.5.6.2	PCR - RFLP	44
2.5.6.3	Gelová elektroforéza.....	45
3	PRAKTICKÁ ČÁST.....	46
3.1	Suroviny.....	46
3.2	Mikroorganismy.....	46
3.3	Chemikálie	46
3.3.1	Živiny přidávané do moštů.....	47
3.4	Přístroje a pomůcky	47
3.5	Příprava kultivačních médií	48
3.5.1	Sladinový agar.....	48
3.5.2	Sladinové médium.....	48
3.5.3	Glukózové médium 1	48
3.5.4	Glukózové médium 2	48
3.6	Příprava pracovních roztoků.....	49
3.6.1	Příprava 10×TBE pufu.....	49
3.6.2	Příprava 1×TBE pufu.....	49
3.6.3	Příprava EtBr.....	49
3.6.4	Příprava délkového standardu 20 bp	49
3.6.5	Příprava PCR směsi.....	49
3.6.6	Příprava 2% agarózového gelu.....	49
3.6.7	Příprava 3 M octanového pufu.....	49
3.6.8	Příprava 80% ethanolu	50
3.6.9	Somogyi-Nelsonovo činidlo I	50
3.6.10	Somogyi-Nelsonovo činidlo II	50
3.6.11	Somogyi-Nelsonovo činidlo III.....	50
3.7	Pracovní postupy.....	50
3.7.1	Zpracování vzorků.....	50
3.7.2	Izolace čisté kultury kvasinek	50
3.7.3	Izolace DNA.....	51
3.7.4	PCR	51

3.7.5	Elektroforetická detekce PCR produktů.....	51
3.7.6	Přečištění PCR produktů	52
3.7.7	Restrikční analýza	52
3.7.8	Elektroforetická detekce restrikčních fragmentů	52
3.7.9	Zkvašování sacharidů	53
3.7.10	Sledování růstu kvasinek.....	53
3.7.11	Sledování osmotolerance kvasinek	54
3.7.12	Sledování tolerance kvasinek k alkoholu	54
3.7.13	Sledování průběhu fermentace	54
3.7.13.1	Stanovení množství uvolněného CO ₂	54
3.7.13.2	Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho-Nelsona	54
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	56
4.1	Izolace čistých kultur kvasinek	56
4.2	Amplifikace DNA pomocí PCR	56
4.3	Restrikční analýza PCR-RFLP	58
4.3.1	Restrikční analýza enzymem <i>HaeIII</i>	58
4.3.2	Restrikční analýza enzymem <i>HinfI</i>	59
4.3.3	Restrikční analýza enzymem <i>HhaI</i>	60
4.3.4	Dendogram identifikovaných kvasinek.....	62
4.4	Zkvašování sacharidů.....	63
4.5	Sledování růstu kvasinek	65
4.6	Sledování osmotolerance kvasinek	70
4.7	Sledování tolerance kvasinek k alkoholu.....	73
4.8	Sledování průběhu fermentace.....	77
4.8.1	Stanovení množství uvolněného CO ₂	77
4.8.1.1	Hmotnost média v průběhu fermentace	78
4.8.1.2	Množství uvolněného CO ₂ v jednotlivých prostředích	78
4.8.1.3	Vliv přídavku živin na průběh fermentace	80
4.8.2	Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho-Nelsona.....	83
5	ZÁVĚR.....	88
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	90
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	94
8	SEZNAM PŘÍLOH.....	96

9	PŘÍLOHY	97
---	---------------	----

1 ÚVOD

Již naši předkové, kteří se zabývali výrobou vína, si uvědomovali, že určité území se vyznačuje výjimečnými podmínkami, které se otisknou do charakteru výsledného vína. Označovali pak svá vína názvem příslušného areálu nebo vinařské obce. V ČR mají dnes tato vína označení VOC – vína originální certifikace. VOC se dnes snaží na tuto tradici navázat a vyzdvihnout tak charakter a optimální kvalitu vín pocházejících z určitých vinařských poloh.

Pojem terroir představuje souhrn mnoha faktorů, jako je složení půdy, druh odrůdy, lokální klima a v neposlední řadě lidský faktor. Vína vyrobená v ověřených oblastech terroir si zachovávají svoji jedinečnost.

Jedním z nejdůležitějších faktorů, které působí na vznikající víno, jsou kvasinky. Na roli kvasinek při fermentaci poukázal už před 125 lety Louis Pasteur. Volba způsobu fermentace a výběr vhodného kmene kvasinek, je zásadním krokem při výrobě kvalitního produktu. V současné době je možné využít spontánní kvašení, řízené kvašení použitím aktivních suchých vinných kvasinek nebo řízené kvašení použitím kvasinky vyskytující se ve vinici – autochtonní kvasinky. Každý ze způsobů má své klady a zápory, nicméně třetí možnost – použití autochtonní kvasinky zdůrazňuje původ, terroir vína. Aplikace kvasinky se specifickým charakterem metabolismu hraje důležitou roli v rozvoji aromatického profilu vína a může ovlivnit kvalitu vína.

Mezi kvasinkami vyskytujícími se v prostředí vinice je možné najít kmeny s různými technologickými vlastnostmi. Tyto kvasinky je nejprve nutné vyizolovat a pomocí vhodné metody identifikovat a taxonomicky zařadit. Za účelem identifikace může být použita např. metoda RFLP-PCR. Po identifikaci se testují technologické vlastnosti kvasinky, jako je tolerance k ethanolu, osmotolerance, killerová aktivita atd. Následuje testování v podmínkách fermentace a senzorická analýza. [1,2,3]

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Réva vinná

Réva vinná, *Vitis vinifera* je vytrvalá, dřevitá rostlina, má dvě základní části – nadzemní a podzemní. Na části nadzemní rozeznáváme různě staré dřevité partie a zelené letorosty. Dřevité části starší dvou let jsou tmavé barvy a odlupují se z nich povrchové části borky. Tyto části se nazývají stařina. Zelené letorosty vyrůstají z částí jednoletého dřeva, které se nazývá réví. Části réví ponechané na keřích mají různou délku, označovanou podle počtu pupenů, kterým se říká očka. Na letorostech se vyvíjejí listy a úponky. Ve spodní polovině letorostů bývají složená květenství, která přecházejí v třapinu, na jejichž částech sedí jednotlivé květy. Réva vinná je samosprašná rostlina. [4]

Podzemní část révy vinné je tvořena kořenovým kmenem, na kterém jsou patrné kořeny středové a patní. Ve spodní části kmene mohou vyrůstat kořeny rosné, které bývají odstraňovány. Hloubka růstu kořenů může dosahovat až několik metrů v závislosti na půdních podmínkách. Kořenový systém zabezpečuje upevnění keře v půdě, ukládání zásobních látek, příjem vody a živin z půdy a tvorbu rostlinných hormonů. [4]

2.1.1 Morfologie hroznu

Tvar hroznu a hustota uspořádání bobulí určuje tvar a charakter třapiny. Rozměr hroznu závisí především na odrůdě révy vinné a ekologických podmínkách. Hrozen si zachovává základní morfologické znaky květenství a skládá se ze stopky, bobule a třapiny. [5]

2.1.1.1 Třapina

Třapina vzniká změnou osy květenství, při níž se zvětšují mechanická a vodivá pletiva a představuje asi 3 – 7 % z celkové hmotnosti hroznu. Chemické složení třapiny je podobné listům. Třapina obsahuje málo cukrů, průměrné množství kyselin především ve formě solí a vysoký podíl fenolických látek. Při nakvašení se z nich velmi snadno vyluhují chuťově nepříjemné látky, proto se před lisováním hroznů odstraňují. [5, 6]

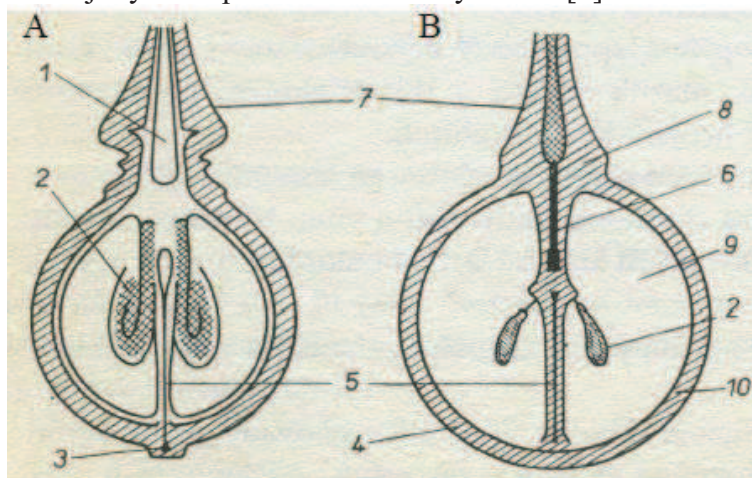
2.1.1.2 Bobule

Bobule (viz obrázek 1) se skládá z pletiv zvaných perikarp, která obklopují semena. Perikarp se rozděluje na exokarp (slupka), endokarp (pletivo ohraničující semeno) a mezokarp (dužnina). [5]

Slupku bobule tvoří kutikula, epidermis a hypodermis. Na povrchu kutikuly se může vyskytovat voskovitý povlak, který snižuje intenzitu odpařování vody, chrání bobule před účinky dešťové vody, postřikových látek, hmyzu a mikroorganismů. Slupka obsahuje cukry, fenolické látky, minerální látky, pektiny, proteiny a enzymy. Bílé odrůdy mají slupku barvy zelené, žlutozelené a jantarové. Červené odrůdy mají slupku červené až červenofialové barvy a modré odrůdy mají slupku tmavočervené, modré až tmavomodré barvy. Tloušťka slupky závisí na typu odrůdy a její hmotnost tvoří 8 – 20 % hmotnosti bobule. [5, 6]

Dužnina tvoří 75 – 85 % z celkové hmotnosti bobule. U většiny odrůd je bezbarvá, někdy je načervenalá nebo červená. Dužnina obsahuje největší podíl šťávy, její stav má vliv na způsob lisování a vylisnost moštu. Hlavními složkami dužiny jsou glukóza, fruktóza, kyselina vinná a kyselina jablečná. [4, 6]

Semeno tvoří 0 – 6 % z celkové hmotnosti bobule. Semena jednotlivých odrůd se liší barvou, tvarem a velikostí. Semena jsou významným zdrojem fenolických látek, které tvoří 20 – 50 %, díky tomu mají význam pro kvalitu červených vín. [5]



Obrázek 1: Průřez bobulí hroznů (A – nezralá bobule, B – zralá bobule; 1 – dřevina, 2 – semena, 3 – blizna, 4 – slupka, 5 – cévní svazek, 6 – štětinka, 7 – stopka, 8 – obal, 9 – dužina, 10 – obvodové cévní svazky) [7]

2.1.2 Chemické složení hroznů

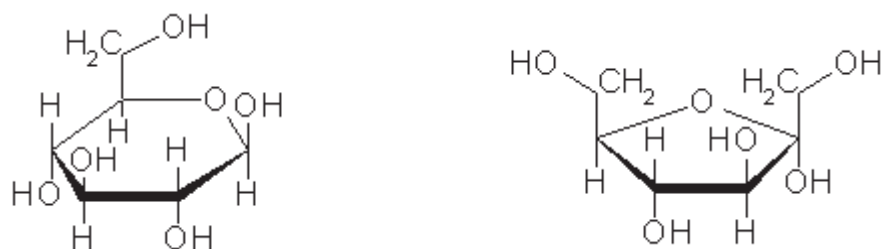
Organické a anorganické sloučeniny v hroznech lze rozdělit na primární (cukry, organické kyseliny, aminokyseliny) a sekundární metabolity (aromatické a fenolické látky). Obě tyto skupiny látek se významně podílejí na určení kvality hroznů. [8]

2.1.2.1 Voda

Voda je obsahově nejvýznamnější součástí bobule révy vinné. Téměř 90 % celkového obsahu vody v moštu přijímá réva kořenovým systémem z půdy. V důsledku hromadění vody v bobulích se zvětšuje objem plodů. Při přezrávání hroznů dochází ke ztrátám vody, vlivem odpařování nebo napadení hroznů hnilobou. [5]

2.1.2.2 Cukry

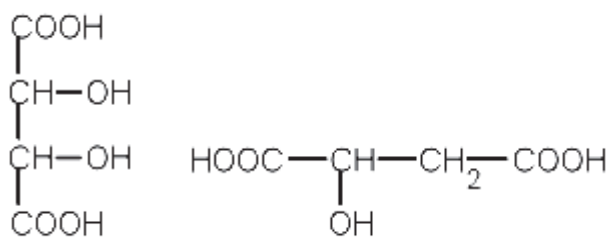
Bobule révy vinné obsahují zejména glukózu a fruktózu (obrázek 2). Ve velmi malém množství pak obsahují rafinózu, maltózu, galaktózu, arabinózu a xylózu. Jejich obsah není významný, protože nejsou metabolizovány kvasinkami a neovlivňují sensorické vlastnosti vína. Cukry se nacházejí hlavně ve vakuolách buněk dužiny a malé množství se vyskytuje ve slupkách bobule. Nejdůležitějším transportním cukrem je sacharóza, která se v bobulích kyselinami nebo enzymaticky invertázou štěpí na glukózu a fruktózu, jejichž poměr je v období sklizně přibližně 1 : 1. Obsah cukrů je důležitý pro stanovení potenciálního obsahu alkoholu ve víně. Vzájemný vztah alkoholu a zbytkového cukru je charakteristický pro určitý typ vína. Zdravé bobule mohou dosáhnout obsahu cukrů 200 – 250 g/l, což odpovídá hodnotám 19,9 – 25,0 °NM. Tyto obsahy cukrů odpovídají osmotickému tlaku 2,2 – 2,3 MPa, pokud by byly hodnoty překročeny, bobule by začala praskat. Zvyšování cukernatosti je možné snížením obsahu vody v hroznu nebo napadením hroznů ušlechtilou formou šedé hniloby *Botrytis cinerea*. [5, 8]



Obrázek 2: *Glukóza a fruktóza*

2.1.2.3 Organické kyseliny

70 – 90 % ze všech organických kyselin, které se nacházejí v bobulích révy vinné, tvoří kyselina vinná a kyselina jablečná (obrázek 3). V malém množství se v hroznech vyskytuje také kyselina citronová. Při hodnocení kyselin v moštu se uvádí celková kyselost a titrovatelná kyselost. Titrovatelné kyseliny v moštu zahrnují organické i anorganické kyseliny (např. kyselinu fosforečnou) a stanovují se neutralizací roztokem hydroxidu o známé normalitě. Koncentrace a složení kyselin v bobulích je závislá na odrůdě, viniční trati, vyzrállosti hroznů a počasí v konkrétním ročníku. V průběhu dozrávání bobulí dochází k oxidaci kyseliny jablečné. Kyselina vinná je stabilnější, její obsah v bobulích se mění minimálně a souvisí s množstvím draslíku v půdě. Kyseliny mají vliv zejména na sensorický projev vyrobeného vína a také slouží jako konzervační činidlo. Vyšší koncentrace titrovatelných kyselin je spojeny s uvolňováním květinového aroma a dalších aromatických prekurzorů ze slupky bobulí v průběhu mletí nebo drcení hroznů. Uvolnění kyselin vinné a jablečné z bobule zodpovídá za hydrolyzu některých aromatických látek bobule. Tyto látky mají vliv na rozvoj zdravého komplexního aromatického profilu během vinifikace a zrání vína. [5, 8]



Obrázek 3: *Kyselina vinná, kyselina jablečná*

2.1.2.4 Dusíkaté látky

Dusík se v bobulích vyskytuje v anorganické a organické formě. Celkový podíl dusíku v moštu se pohybuje v rozmezí 100 – 1200 mg/l. Hlavními dusíkatými sloučeninami jsou aminokyseliny, bílkoviny a amonné sloučeniny.

Aminokyseliny jsou prekurzory aromatických látek, jejich profil podmiňuje vůni vína. Kromě dusíku jsou také zdrojem síry. Asimilovatelné volné aminokyseliny tvoří 51 – 92 % z celkového asimilovatelného dusíku v bobulích v okamžiku sklizně. K nejvíce zastoupeným aminokyselinám patří arginin a prolin. V závislosti na výživě vinice se hlavní aminokyselinou, kterou mohou kvasinky využívat, může stát i glutamin.

Množství minerálního dusíku, zastoupeného především amonnými sloučeninami, se zráním hroznů postupně snižuje a v okamžiku sklizně činí 5 – 10 %. Amonné ionty jsou jako zdroj dusíku kvasinkami upřednostňovány.

Bílkoviny vznikají v bobulích ve větším množství za teplého a suchého počasí. Vyšší obsah bílkovin může způsobovat problémy s kvašením moštů a ve víně pak může způsobovat bílkovinné zákaly. [5]

2.1.2.5 Minerální látky

Réva vinná přijímá minerální látky z půdy především kořenovým systémem a částečně listovou plochou. Zastoupení minerálních látek v bobulích ovlivňuje kvalitu moštů a vín. Během vývoje se postupně v bobulích hromadí K, P, S, Mg, B, Fe a Cu. V dužnině a slupce bobulí se nachází hlavně K, B, Fe, Cu, v semenech se vyskytuje Ca, P, Mg, S, Mn a Zn. [5]

2.1.2.6 Aromatické látky

Aromatický profil hroznů a vína vzniká vzájemnou kombinací mnoha různých aromatických látek. Bobule mohou obsahovat dva typy aromatických sloučenin – volné aromatické látky a prekurzory aromatických látek. Volné aromatické látky se v hroznech nacházejí i v těkavé formě. Při zpracování hroznu se rychle uvolňují a z kvasícího moštu unikají společně s oxidem uhličitým. Větší množství aromatických látek se v bobulích vyskytuje jakožto vázané aromatické látky, nejčastěji ve formě glykosidů. Aromatické látky se uvolňují po odštěpení cukru, k čemuž dochází při hydrolýze v kyselém prostředí nebo enzymatickou hydrolýzou.

V hroznech se vyskytují aromatické látky, které působí na kvalitu vína pozitivně i negativně. Mezi nejvýznamnější skupiny aromatických látek patří monoterpeny, karotenoidy, C₁₃-norisoprenoidy, methoxypyraziny a vonné thioly. [5]

2.1.2.7 Fenolické látky

Fenolické látky odpovídají za barvu, hořkou chuť a antioxidační vlastnosti. Mezi odrůdami určenými pro výrobu bílých a červených vín je, co do obsahu a složení fenolických látek, značný rozdíl. Fenolické látky se rozdělují na flavonoidy a neflavonoidy. Mezi neflavonoidy patří kyseliny hydroxybenzoové, kyseliny hydroxyskořicové a stilbeny. Mezi flavonoidy nacházející se v hroznech a víně patří antokyany, flavonoly a flavanoly. V bobulích se vyskytují ve formě glukosidů, galaktosidů a glukuronoidů. Antokyanová barviva, která se nacházejí zejména u modrých odrůd, a to ve slupce a v dužnině se vytvářejí v průběhu zrání hroznů a jejich složení se u jednotlivých odrůd liší.

Pro chuťové vlastnosti a strukturu vína mají význam flavan-3-oly a jejich polymery zvané taniny či třísloviny. Semeno a slupka obsahují jednoduché flavan-3-oly katechin a epikatechin. Taniny mohou být hořké nebo tříslovité chuti. Hořké tóny způsobují sloučeniny semen, tříslovité sloučeniny slupky. [5, 8]

2.1.3 Odrůdy révy vinné

Neustálým procesem šlechtění, klonování a křížení vznikají nové odrůdy révy vinné. Každá odrůda plodí hrozny, které se navzájem liší barvou, velikostí, složením a chutí. Odrůdy révy vinné pěstované na území České republiky musí být evidovány ve Státní odrůdové knize (tabulka viz příloha 1). V knize jsou abecedně seřazeny odrůdy **moštové**, pro výrobu

červeného a bílého jakostního vína, dále odrůdy **stolní**, které se pěstují za účelem přímé konzumace, a **podnože**, na které se v České Republice smí štěpovat. [4]

2.2 Kvalita vína a vinařská legislativa

V současném systému hodnocení kvality vín jsou vína rozdělena podle minimální cukernatosti hroznů do jakostních tříd (viz tabulka 1). Tento systém se nazývá **germánský systém** pohledu na kvalitu vína, jehož základem je stanovení cukernatost moštu, vylisovaného ze sklizených hroznů, naměřenou ve stupních normalizovaného moštoměru (°NM), tedy obsah cukru v kilogramech na 100 litrů moštu. [4]

Tabulka 1: Jakostní třídy vína [4]

Kategorie vín	Minimální cukernatost hroznů	Přirozený obsah alkoholu
Stolní víno	11 °NM	6,5 % obj.
Zemské víno	14 °NM	8,3 % obj.
Jakostní víno		
odrůdové	15 °NM	8,9 % obj.
známkové	15 °NM	8,9 % obj.
Jakostní víno s přívlastkem		
kabinetní víno	19 °NM	11,3 % obj.
pozdní sběr	21 °NM	12,5 % obj.
výběr z hroznů	24 °NM	14,3 % obj.
výběr z bobulí	27 °NM	16,1 % obj.
výběr z cibéb	32 °NM	19,0 % obj.
ledové víno	27 °NM	16,1 % obj.
slámové víno	27 °NM	16,1 % obj.

Germánský systém pohledu na kvalitu vína neuvažuje původ hroznů, který dává vínu nezaměnitelný charakter. Současně s germánským systémem se používá tzv. **románský (apelační) systém**, který je zaměřen zejména na původ hroznů. Ve Francii je tento systém označován AOC, v Itálii DOC, v Rakousku DAC a v České Republice VOC. [4]

Označení víno originální certifikace (V. O. C. nebo VOC) má za úkol vyzdvihnout charakter a optimální kvalitu vína. Tato vína jsou specifická tím, že hrozny, ze kterých jsou vyrobeny, pocházejí pouze z vinic ležících ve schválených polohách daného regionu. Francouzští vinaři označují tyto lokality termínem „terroir“, který se proto používá po celém světě. Vinaři sami vybírají tratě, které jsou pro výrobu VOC nejvhodnější. Tento přísný výběr poloh s originálním půdním složením dává vínům jedinečné vlastnosti. Do systému VOC jsou zaraženy nejtýpickejší odrůdy daného vinařského regionu. Vinaři si sami v rámci sdružení vína hodnotí, ověřují původ hroznů a charakter vyráběných vín. Na území ČR jsou v současné době sdružení VOC Znojmo, VOC Pálava, VOC Mikulov, VOC Blatnice a VOC Modré Hory. [2, 8]

Víno originální certifikace mohou produkovat členové sdružení vinařů, jehož fungování je povoleno Ministerstvem zemědělství ČR. Členy tohoto sdružení mohou být pěstitelé, kteří mají vinice v dané lokalitě a jsou zároveň výrobci nebo výrobci, kteří nakupují hrozny z místních poloh. Obecné zásady pro vína VOC definuje zákon č. 321/2004 Sb., O vinohradnictví a vinařství, a to v ustanovení §23. [2, 8]

Kromě požadavků na kvalitu musí víno, jakožto alkoholický nápoj, jeho výroba a samotné suroviny splňovat řadu **legislativních požadavků**.

V současné době platí zákon č. 321/2004 Sb. O vinohradnictví a vinařství, který zahrnuje množství odkazů na Nařízení Rady a Komise Evropského společenství a podrobně upravuje problémy, které se týkají České republiky. [4]

Evropské předpisy

- Nařízení Rady (ES) č. 1234/2007 (základní nařízení pro celé zemědělství, tj. i pro vinařství)
- Nařízení Komise (ES) č. 606/2009 o enologických postupech
- Nařízení Komise (ES) č. 607/2009 o označování vína
- Nařízení Komise (ES) č. 436/2009 o registru vinic, hlášeních, průvodních dokladech při přepravě vína a evidenčních knihách
- Nařízení Komise (EU) č. 203/2012 o biovínu

Zákon č. 321/2004 Sb. v aktuálním znění se nevztahuje na vinné hrozny určené k přímé lidské spotřebě, hroznovou šťávu, zahuštěnou hroznovou šťávu, vinný ocet a nedotýká se ustanovení zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích.

Mimo odkazů na evropské normy je zákon doplněn vyhláškami, které podrobněji upravují některá ustanovení a obsahují desítky formulářů. Je to vyhláška prováděcí zákon č. 323/2004 Sb. v aktuálním znění, což je základní prováděcí předpis k vinařskému zákonu a dále je to vyhláška stanovující podoblasti obce a tratě č. 254/2010 Sb. v aktuálním znění.

Podrobněji jsou upraveny například výrobní postupy a ošetřování vína a způsob vedení evidence, seznam vinařských podoblastí, obcí, viničních tratí a seznam odrůd révy vinné v jednotlivých vinařských oblastech, z jejichž hroznů lze vyrábět víno s přívlastkem. Vyhláška stanovuje podrobnosti při uvádění údajů na obalu vína nebo výrobků z hroznů révy vinné. [4, 9]

Všichni, kdo vlastní vinice o rozloze 1000 m² a více nebo jejich produkce přesahuje 10 hektolitřů, dále obchodníci a zprostředkovatelé, kteří uvádí své produkty do oběhu, musí podávat příslušná hlášení a vést sklepní evidenci. Každý vinohradník a vinař musí při registraci a poté každý rok zakoupit tzv. sklepní knihu, která obsahuje potřebné informace a formuláře. [4]

2.3 Technologie výroby bílého vína

2.3.1 Sklizeň hroznů

Termín sklizeň závisí na vyzrállosti hroznů, jejich zdravotním stavu a na typu požadovaného vína. Hrozny ranějších odrůd se sklízí již na počátku září, hlavní sklizeň připadá na konec září a podle počasí se může prodloužit až na počátek listopadu. Proces zrání

se dá zjistit na základě obsahu kyselin, který se snižuje, a obsahu cukru, který se zvyšuje. Určení doby sklizně má zásadní význam pro kvalitu a množství získaného vína. Sklizeň je vhodné provádět při suchém počasí, aby nedošlo k ředění moštu vodou. Sklizeň může být provedena ručně nebo mechanicky pomocí sklízečů. [10, 11]

2.3.2 Příjem a zpracování hroznů

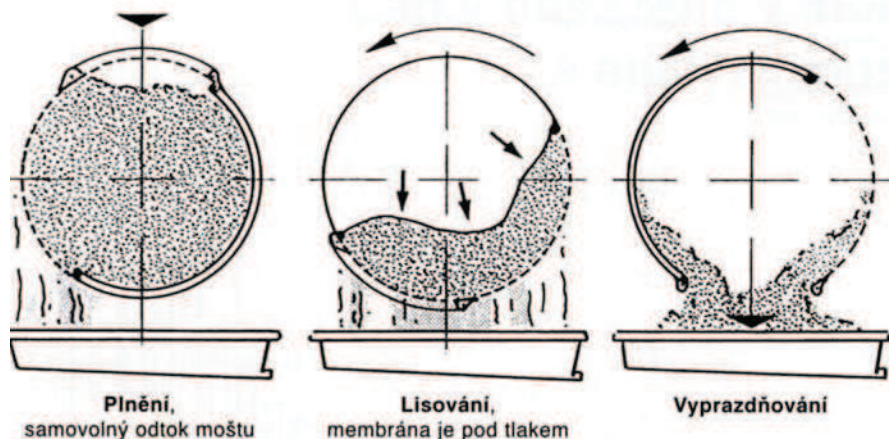
Při příjmu je důležitá opatrnost k hroznům z hlediska mechanického poškození. Za optimální se považuje doprava využívající gravitační spád, kdy jsou hrozny dopravovány pouze vlastní hmotností. Přijímají se buď celé hrozny v bednách a kontejnerech nebo rozdrčené hrozny a rmut nebo mošt, získaný pomocí polního lisu. Při zpracování hroznů je nutné dbát na oddělování nahnílých, nedozrálých, plesnivých a jinak poškozených hroznů. Musí být zajištěna inaktivace oxidačních enzymů. [12]

2.3.3 Příprava rmutu

Před samotným lisováním, je třeba hrozny rozemlít, aby se při lisování lépe uvolňoval mošt. Při mletí nesmí být porušena semena a rozmačkány třapiny, aby do rmutu nepřešly nežádoucí chlorofyly a třísloviny. Pro přípravu rmutu se používají mlýnky, odzrňovače a mlýnkoodzrňovače. Rmut určený pro výrobu bílého vína se lisuje buď hned, nebo se nechá 3 – 6 hodin macerovat z důvodu lepší extrakce aromatických látek přítomných ve slupce bobulí. [13]

2.3.4 Příprava moštu

Mošt vzniká lisováním rmutu, jehož schéma je na obrázku 4. Používají se hydraulické, šroubové a pneumatické lisy. Výlisnost je ovlivňována odrůdou hroznů, stupněm zralosti hroznů, typem použitého lisu a způsobem zpracování. Se stoupající výlisností klesá kvalita vína. Rychlost lisování závisí na vlhkosti a konzistenci lisovaného materiálu, způsobu rozdrčení a typu lisovacího zařízení. Aby se urychlilo lisování rmutu, odcezuje se mošt, který samovolně vytéká z bobulí rozdrčených hroznů. Odcezený mošt se nazývá samotok a musí se scelit s moštem získaným lisováním. Na začátku lisování se používá nízký tlak, aby mohla kapalná fáze co nejlépe odtéct. Poté se tlak pomalu zvyšuje až k přípustné hranici. Pod tímto tlakem se lis nechá, dokud nepřestane mošt odtékat. Poté se odstraní matolinový koláč, matoliny se rozdrťí a znovu plní do lisu. Lisování se opakuje dvakrát, někdy třikrát. 50 % z celkového množství moštu tvoří samotok, obsahuje nejvíce cukru a buketních látek. 27 % moštu vzniká při prvním lisování, pochází z dužiny a slupek a obsahuje hodně cukru, méně tříslovin a kyselin. 10 % moštu pochází z druhého lisování, obsahuje málo cukru, hodně tříslovin, dusíkatých látek a barviva. Poslední 3 % moštu ze třetího lisování obsahují velmi malé množství cukru, hodně tříslovin a barviva. Matoliny se mohou po ukončení lisování použít ke krmení hospodářských zvířat nebo do kompostů. [12,13]



Obrázek 4: Schéma lisování [14]

2.3.5 Úpravy moštu

Úprava moštu znamená odstranění nebo částečné zlepšení jeho přirozených nedostatků. Nedostatkem se nazývá zhoršení kvality moštu způsobené buď absencí nebo přebytkem některého z komponentů moštu nebo vína. [12]

2.3.5.1 Odkalování moštů

Odkalením se odstraňují mechanické nečistoty a zbytky chemických přípravků, používaných při ochraně révy vinné proti chorobám a škůdcům. Tyto nečistoty mohou negativně ovlivnit kvašení a kvalitu vína, a proto musí být odstraněny ještě před kvašením. Mošty z nahnilých hroznů musí být odkaleny vždy, a to co nejrychleji. Odkalování by nemělo být přehnané, mošty pak velmi špatně prokvaší, i když jsou zakvašeny čistými kvasničnými kulturami. Odkalování moštu je možné provést buď fyzikálně-chemickým zásahem pomocí oxidu siřičitého, ochlazováním, zahříváním nebo mechanickým způsobem pomocí odstředivky nebo filtrů. [15, 12]

2.3.5.2 Úprava cukernatosti

V nepříznivých letech hrozny některých odrůd nedosáhnou technologické zralosti a mošty pak mají nižší cukernatost. Dobrá kvalita moštu a budoucího vína se posuzuje hlavně podle vzájemného poměru obsahu cukru a kyselin. Cukernatost se zvyšuje přidáním rafinovaného řepného cukru nebo zahuštěného moštu. Cukr se rozpustí ve dvou až trojnásobném objemu moštu, po rozpuštění se přečerpá do kvasných nádob a promíchá se s celým objemem. Zahuštěné mošty se vyrábějí z révových moštů ve vakuových odparkách při teplotě 35 °C a obsahují 50 – 60 % cukru. K měření cukernatosti se v České republice a na Slovensku používá normalizovaný moštoměr, který udává množství cukru ve 100 l moštu při teplotě 15 °C (°NM). Zvýšení obsahu cukru v moštu o 1 °NM se dosáhne přidáním, 1,053 kg cukru na 100 l moštu. Z hodnoty cukernatosti lze vypočítat, kolik teoreticky bude mít víno alkoholu (viz tabulka příloha 2). [8, 12, 15]

V našich vinařských podmínkách se upravuje cukernatost bílých moštů na 21 °NM. Vinaři se musí řídit Zákonem č. 321/2004 Sb. v aktuálním znění, §13, Přirozený obsah alkoholu. Postup při zvyšování a limity alkoholu u stolních, zemských a jakostních vín uvádí Státní zemědělská a potravinářská inspekce (viz tabulka příloha 3). [16]

2.3.5.3 Úprava kyselosti moštů

Mošty z nedozrálých hroznů mívají vysoký obsah kyselin a vína z nich jsou často kyselá. V moštu se v největší koncentraci vyskytuje kyselina vinná a kyselina jablečná. Během růstu a zrání hroznů se obě kyseliny částečně odbourávají. Ne vždy reakce probíhají dostatečně intenzivně a část kyselin je nutné odstranit. Obsah kyselin se snižuje srážením kyseliny vinné uhličitanem vápenatým a biologickým odbouráním kyseliny jablečné.

K odstranění 100 g kyseliny vinné je třeba 67 g uhličitanu vápenatého, reakcí vzniká vinan vápenatý. Kyselina jablečná se uhličitanem vápenatým nesráží, tvoří ve víně rozpustný jablečnan vápenatý, který dodává moštu i vínu nežádoucí pachut'. Mošty se proto odkyselují tak, aby v 1 l zůstal alespoň 1 g kyseliny vinné, která zamezí ovlivnění chutě jablečanem vápenatým. Kyselost moštu lze snížit také scelením s méně kyselým moštem stejné odrůdy, promícháním moštu s kvasnicemi případně delším ležením vína na kvasnicích.

Pokud mošty obsahují málo kyselin, hrozí nebezpečí, že víno bude fádní, neharmonické a bude mít sklon k rychlému stárnutí. Tyto mošty je možné okyselit přidáním kyseliny vinné v maximálním množství 2 g/l moštu. Nejčastěji se málo kyselý mošt scelují s kyselými mošty tak, aby výsledné množství kyseliny vinné bylo 7 – 9 g/l moštu. [7]

2.3.5.4 Sírění moštů

K síření moštů se používá oxid siřičitý, který současně působí jako redukční a antiseptické činidlo a je účinný proti enzymovým oxidacím. Oxid siřičitý váže kyslík a zabraňuje tím oksylovení ostatních složek. Antiseptický účinek je silnější vůči bakteriím a divokým kvasinkám než vůči ušlechtilým kvasinkám. K zabránění rozvoje bakterií, plísní a apikulátních kvasinek stačí dávka 50 – 150 mg /l, ušlechtilé kvasinky jsou inhibovány dávkou 200 – 600 mg/l SO₂. Oxid siřičitý se váže na barevné a aromatické látky, tím zabraňuje jejich ztrátám. Působí příznivě na tvorbu buketu i chuťových látek budoucího vína a ovlivňuje jeho jakost i stabilitu. [7]

Mošty se síří spalováním sirných knotů v nádobách, do nichž jsou plněny. Dále se síří použitím disiřičitanu draselného, který reaguje s kyselinou vinnou za vzniku vinanu draselného a oxidu siřičitého. Oxid siřičitý je možné aplikovat jako plynný z bombiček s přesným dávkovačem.

Zdravé mošty se síří dávkou 5 – 10 g/hl. Mošty z poškozených, nahnilých nebo namrzlých hroznů se síří dávkami 15 – 20 g/hl moštu. [12]

2.3.5.5 Provozdušňování moštů

Mošty se obohacují vzdušným kyslíkem, což podporuje množení kvasinek a sedimentaci bílkovinných látek, pektinů a tříslovin. Provozdušňovat se mohou jen mošty ze zdravých hroznů, protože mošty z nahnilých hroznů snadno podléhají oxidačním enzymům. Dále by mohlo dojít k rozvoji aerobních mikrobů, které vyvolávají octové kvašení a neenzymové oxidační procesy.

Obvykle se mošty provozdušňují přívodem vzduchu kompresorem do cisteren a tanků nebo tak, že mošt teče z lisu do kádě, ze které se čerpá do kvasných nádob. [15]

2.3.6 Alkoholové kvašení

Alkoholové kvašení je anaerobní přeměna cukrů, zejména glukózy a fruktózy na ethanol a oxid uhličitý podle rovnice:



Podle rovnice by teoreticky mělo ze 100 g glukózy vzniknout 51,11g ethanolu a 48,89 g oxidu uhličitého. Ve skutečnosti vznikne pouze 47 – 48 g ethanolu. Alkoholové kvašení je komplexní proces, zahrnující řadu biochemických, chemických a fyzikálně-chemických přeměn, které vedou k řadě vedlejších produktů. Spektrum vedlejších produktů je závislé na složení moštu a na vlastnostech kvasinek, které se účastní kvašení. Tyto produkty ovlivňují aromatický profil vína a jsou to např. vyšší alkoholy, estery, glycerol, kyselina mléčná, kyselina octová, 2,3-butandiol, atd.. [6, 17]

- **Ethanol** má ve víně konzervační účinek, chrání víno před negativním působením mikroorganismů. Množství vzniklého ethanolu závisí na vyzrálosti hroznů a pohybuje se kolem 12 – 13 % obj.
- **Oxid uhličitý** je nedýchateľný plyn, bez barvy a zápachu. Uvolňuje se během kvašení v množství asi 46,6 g na 100 g cukru, což odpovídá objemu 25,3 litru a dále vzniká při jablečno-mléčné fermentaci. Ve víně zůstává rozpuštěné pouze malé množství CO₂. Pokud dosáhne koncentrace rozpuštěného CO₂ 15 g/l, dochází k zastavení kvašení.
- **Glycerol** má sladkou chuť, vínu dodává plnost a jemnost, a v největším množství vzniká na začátku kvašení. Obvykle se koncentrace glycerolu ve víně pohybuje v rozmezí 4 – 9 g/l. Vyšší obsah glycerolu poskytují vyzrálější hrozny nebo hrozny napadené ušlechtilou plísní.
- **Acetoin, 2,3-butandiol, diacetyl** vznikají při kvašení v nízké koncentraci a dávají vínu oříškové aroma. Působením bakterií mléčného kvašení dochází zvýšení jejich těchto sloučenin a ke vzniku máslového aroma vína.
- **Acetaldehyd** při kvašení vzniká v nízké koncentraci. Může vzniknout chemickou nebo biologickou oxidací ethanolu. Nízké koncentrace acetaldehydu dávají vínu ovocné aroma, vysoké koncentrace způsobují štiplavý zápach vína. Průměrná koncentrace acetaldehydu je 30 mg/l u bílého vína a 80 mg/l u červeného vína
- **Kyselina octová** ve vyšších koncentracích způsobuje octové aroma a nepříjemnou příchut' vína. Během fermentace působením *Saccharomyces cerevisiae* obvykle vzniká 0,1 – 0,3 g/l kyseliny octové. Vyšší koncentrace může být způsobena rozvojem octových bakterií a bakterií mléčného kvašení.
- **Vyšší alkoholy** jsou sekundární metabolity kvasinek. V závislosti na koncentraci mohou mít pozitivní nebo negativní vliv na chuť a vůni vína. Koncentrace vyšších alkoholů, nižší než 300 mg/l, přispívá k ovocnému aroma a komplexnosti vína. Vyšší koncentrace zhoršují kvalitu vína.
- **Estery** jsou zastoupeny ve dvou skupinách, a to acetáty vyšších alkoholů a estery vyšších mastných kyselin a ethanolu. Acetáty vyšších alkoholů jsou nositelé např. banánového aroma (isoamylacetát) nebo aroma růže (fenyletanolacetát). Estery mastných kyselin a ethanolu jsou příčinou ovocných aromat. [17,18]

Mošt z hroznů révy vinné obsahuje glukózu a fruktózu, nejčastěji v poměru 1 : 1. Vinné kvasinky tyto cukry velmi dobře zpracovávají. V průběhu kvašení rychleji využívají glukózu, pomaleji fruktózu, která se častěji ve víně vyskytuje jako zbytkový cukr.

Pro zahájení kvašení je třeba asi 10 milionů buněk /ml. Lisy a zařízení jsou nejdůležitějšími zdroji infekce, kde se až stonásobně zvyšuje přirozený počet buněk v moštu. Počet kvasinek kolísá v závislosti na počasí, odrůdě, chemické ochraně na vinici a způsobu zpracování hroznů.

Kvašení může probíhat **spontánně** prostřednictvím kvasinek přirozeně se vyskytujících na bobulích, v moštech a ve sklepech, nebo **řízeně**, zaočkováním moštu čistými kulturami kvasinek. Třetí cestou je spojení výhod spontánního kvašení a použití čisté kultury kvasinek, kvašení pomocí autochtonních kvasinek. [6, 8, 19]

2.3.6.1 Spontánní kvašení

Spontánní kvašení patří mezi tradiční technologie výroby vína a je charakteristické přítomností řady různých rodů a druhů kvasinek, které pocházejí přímo z hroznů nebo z prostředí vinařství. Spontánní fermentace probíhá samovolně, kromě sifení se neprovádí žádné zásahy.

V počáteční fázi kvašení se uplatňují slabě kvasící apikulátní kvasinky, které v prvních dnech kvašení tvoří až 99 % celkové populace kvasinek. Postupně se stávají dominantní ušlechtilé vinné kvasinky druhu *Sacharomyces cerevisiae*, které snášejí vyšší koncentrace ethanolu v prostředí. Koncentrace ethanolu je hlavní faktor omezující růst apikulátních kvasinek, pro které je limitní koncentrace 5 – 7 % ethanolu. V poslední fázi alkoholové fermentace se populace *Sacharomyces cerevisiae* zmenšuje, jakmile přestanou být aktivní i odolnější variety *Sacharomyces bayanus*, dojde k zastavení kvasného procesu. [21]

Vína vyrobená touto technologií vyžadují delší čas na výrobu, přičemž se vytváří komplexní spektrum aromatických látek. V tomto případě se kvasinky v přítomnosti kyslíku namnoží na potřebný počet buněk samy. Podle aktuálních podmínek (SO₂, teplota, výchozí počet kvasinek, rezidua přípravků na ochranu rostlin) se může prosadit různý druh kvasinek. Vzhledem k rozmanité mikroflóře je důležitá průběžná kontrola aplikace SO₂.

Technologie spontánního kvašení je vhodná především pro dokonale vyzrálé, zdravé hrozny. Kvašení začíná lépe ve vinném sklepě, kde již nějaký mošt kvasí a je zde tedy vyšší výskyt mikroflóry. Ve sklepě je třeba udržovat absolutní čistotu a teplota v kvasné nádobě by neměla překročit 18 °C. [8]

Pro spontánní kvašení je charakteristický vyšší obsah glycerolu, vyšších alkoholů, těkavých kyselin, potřeba oxidu siřičitého a častý zůstatek zbytkového cukru z důvodu samovolného zastavení kvašení. Aromatický a chuťový vývoj připravených vín je delší než u vín z řízeného kvašení. Vína bývají v ideálním stavu v období března až května. Aromaticky jsou velmi výrazná a chuťově plná, za což jsou zodpovědné apikulátní kvasinky, které mohou mít za určitých podmínek pozitivní vliv na vývoj chutě a vůně vína. [8]

2.3.6.2 Kvašení pomocí čistých kultur kvasinek

Čistá kultura je populace, která vznikla pomnožením jedné kvasničné buňky. Řada vinařů používá k zakvašení vylisovaných moštů čisté kultury *Sacharomyces cerevisiae* v sušené formě, zvané aktivní suché vinné kvasinky (ASVK). Použití ASVK může zajistit

bezproblémový start alkoholové fermentace, její průběh i závěr. Výsledkem je rychlejší a kompletní zkvašení moštu. V průmyslové výrobě vína je spolehlivý a předvídatelný průběh fermentace nezbytný. Používá se pro produkci suchých vín o určité standardní kvalitě, s minimální koncentrací vedlejších produktů anaerobní glykolýzy. [1, 21]

Zakvašování moštu čistými kvasinkovými kulturami se používá, pokud by se spontánním kvašením nezískalo víno ani průměrné jakosti. Přídavek kvasinek je vhodný při použití pasterizovaného moštu, moštu o vysoké cukernatosti nebo moštu z nahnilých hroznů. V mošttech z nahnilých hroznů bývá nedostatek kulturních kvasinek a mošty po odkalení kvasí slabě a pomalu. Aby tyto mošty dobře prokvasily, přidávají se čisté kvasinkové kultury. Kvasinkové kmeny různě odolávají chladu, vyšším koncentracím cukru, ethanolu a oxidu siřičitého. Toho se využívá při výběru vhodného kmene pro výrobu vína. Např. na dokvašení silně zasířených moštů se používají sulfítové kvasinky, které jsou odolné vůči vyšší koncentraci oxidu siřičitého a ethanolu. [8, 21]

Nabízené sušené kvasinky je nutné před použitím 10 – 15 minut revitalizovat ve vlažné směsi moštu a vína. Poté se směs nalije do moštu, který má prokvasit. Důležité je vyvarovat se tepelnému šoku. Pokud má mošt výrazně odlišnou teplotu, měl by se nejprve do směsi s kvasinkami přilévat mošt až do vyrovnání teplot a poté celý obsah vlít do moštu. [8]

Z hlediska zachování autenticity vína je použití ASVK nevhodné, protože v ČR není výrobce ASVK, kvasinky pochází z Francie, Německa, Chile, Jihoafrické republiky a vína tak dostávají globální uniformní charakter. [22]

Kromě jedné čisté kultury je možné na zakvašování moštu použít směs čistých kultur. Kultivace a izolace kvasinek se provádí u každé kultury zvlášť, smísí se až při zakvašování. V chemickém složení vín zakvašenými čistými kulturami nebo směsí kultur kvasinek není rozdíl. Zakvašování směsí čistých kultur se však více přibližuje přirozeným podmínkám kvašení. [8, 21]

2.3.7 Kvašení pomocí autochtonních kvasinek

Někteří vinaři používají jako startovací kulturu kvasinky izolované z prostředí vlastní vinice. Dochází tak ke spojení výhod spontánního kvašení a použití čisté kultury kvasinek. Autochtonní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou přirozenou součástí mikroflóry vinice, jsou geograficky jedinečné a natolik geneticky pestré, že je možné mezi nimi najít kmeny s různými technologickými vlastnostmi. Vznikají bez cílené genetické manipulace, pouze působením selekčních tlaků prostředí. Izolace autochtonních kmenů *Saccharomyces cerevisiae* se provádí ve vinici. Platí proto, že by vinice neměla přijít do kontaktu s komerční kulturou. [1]

Získání vhodné čisté kultury, která může být aplikovaná do praxe, obnáší izolaci z přírodního materiálu, taxonomické zařazení a zkoumání pozitivních a negativních technologických vlivů. Před zavedením izolované kvasinky do praxe se provádí laboratorní testy fermentace, kdy se fermentují malé objemy hroznového moštu, vína nebo upravené fermentační médium s přesně definovaným chemickým složením. Produkt se chemicky a senzoricky analyzuje a posuzuje se vhodnost kmene pro vinařskou praxi. [1]

Pro vlastní zákvas je nutné posbírat menší množství hroznů z vinice přibližně o týden dříve. Připravený mošt se musí odkalit pouze mírně, aby zůstala zachována přirozená

mikroflóra. Jakmile je v kvašení dominantní ušlechtilá kvasinka (3 – 4 % obj. alkoholu), přidá se zbytek moštu. Aby byla iniciace fermentace rychlá a předešlo se aktivitě apikulátních kvasinek, přidává se do moštu alespoň 1 % objemu zákvasu. [22,23]

Otázkami selekce vhodných kmenů vinných kvasinek na základě jejich vlastností se zabýval již na konci 19. století Müller-Thurgau. Mezi tyto vlastnosti patří hlavně rychlost kvašení, dobrá aktivita kvasinek během kvašení, dobrá schopnost finálního dokvašení, tolerance k alkoholu, dobrá schopnost kvašení při nízkých teplotách, tvorba dobrého kvasného aroma, nízká tvorba kyseliny octové a sirných sloučenin. Dalšími důležitými vlastnostmi jsou tolerance k vysoké koncentraci cukru, rezistence a nízká produkce oxidu siřičitého, rezistence ke killer toxinu a dobré enzymové vybavení. [1, 24]

V České republice vyrábí vína pomocí autochtonních čistých kultur vinných kvasinek např. Znovín Znojmo, a. s., Sonberk, a.s., Popice a další menší vinařství. [1]

2.3.7.1 Faktory ovlivňující alkoholové kvašení

Alkoholové kvašení hroznového moštu ovlivňuje řada faktorů, které je třeba zohlednit:

Teplota

Optimální teplota pro kvašení a množení buněk je okolo 25 °C, větší odchylky od této střední hodnoty brzdí metabolismus kvasinek. Aby nedocházelo ke stresu kvasinek rychlou změnou teploty, měla by se teplota měnit maximálně o 4 °C za hodinu. Důležitým faktorem pro zvolení výchozí teploty je objem nádoby. Čím je větší objem kvasné nádoby, tím intenzivněji se mošt během kvašení ohřívá a tím nižší může být zvolena počáteční teplota.

Při velmi vysokých teplotách kvašení (35 – 37 °C) může dojít k zastavení kvašení, které bývá označováno jako uvaření. S vyšší teplotou kvašení se zvyšuje pravděpodobnost, že mošt bude prokvašen beze zbytku, zároveň však dochází k vyšším ztrátám aromatických látek a alkoholu.

Při teplotách 12 – 15 °C dochází ke studené fermentaci, k níž je potřeba použít speciální kvasinky pro tento druh fermentace. Výhodou tohoto typu fermentace je vyšší obsah alkoholu, a aromatických látek. Při nízkých teplotách se nemohou rozmnožovat nežádoucí kvasinky a bakterie mléčného a octového kvašení. Kvašení je však pomalejší a je tedy třeba vyšších dávek SO₂. [6]

Obsah cukru v moštu

Mošty s nízkou cukernatostí kvasí bez problému, u vín s celkovým obsahem alkoholu pod 11 % obj. se problémy s kvašením příliš nevyskytují. Zvýšený obsah cukrů na 250 – 300 g/l způsobuje pomalejší kvašení, koncentrace nad 700 g/l zcela brání množení mikroorganismů. V důsledku vysokého obsahu cukrů, dochází ke zvýšení osmotického tlaku. Mošt pak významně odnímá kvasinkám z buněk vodu, a s tím se snižuje intenzita jejich množení. V případě kvašení moštů pro vína s přívlastkem, musí být kvasinky nejen schopny dobře prokvašet mošt, ale musí být i osmotolerantní. [4,6]

Obsah alkoholu

Obsah alkoholu, který vzniká při kvašení, omezuje činnost kvasinek v závislosti na teplotě, provzdušnění moštu a vlastnostech použitého kmene kvasinek. Divoké kvasinky odumírají při 3 – 4 obj. % alkoholu a jejich činnost přebírají ušlechtilé kvasinky druhu *Saccharomyces*

cerevisiae, které snášejí obsah alkoholu do 13 % obj. Při vyšším obsahu alkoholu prokvášejí mošty kvasinky druhu *Saccharomyces bayanus*, které se dokážou rozmnožovat a kvasit při 15-16 % obj. Při vyšších hodnotách se jejich činnost zcela zastaví. [6, 8]

Přítomnost kyslíku

Kyslík hraje nezastupitelnou roli při množení kvasinek a umožňuje jim přežít v silně reduktivním prostředí, které vytvářejí svou činností. Za celou dobu kvašení je spotřeba kyslíku 10 – 20 mg/l. Kyslík se dává v počáteční fázi kvašení, kdy nehrozí nebezpečí oxidace jednotlivých složek vína. Často opakované přídavky kyslíku v pozdějším stádiu kvašení způsobují ztrátu svěžího aroma výsledného vína. Kyslík rovněž přispívá k lepší využitelnosti asimilovatelného dusíku. [8]

Obsah asimilovatelného dusíku

Kvasinky potřebují dusík ve formě amonné a také ve formě volných α -aminokyselin. Nedokážou asimilovat aminokyselinu prolin a bílkoviny. Nedostatek asimilovatelného dusíku se může projevit poruchami a zastavením kvašení. Mošty s obsahem amoniakálního dusíku menším než 50 mg/l se musí dusíkem obohacovat. Obohacuje se přídavkem síranu amonného o koncentraci 10 – 20 g/hl. Dále lze použít přípravky na bázi hydrogenfosforečnanu diamonného nebo sušených buněčných stěn kvasinek. [8]

Vitaminy

Vitaminy potřebné pro rozvoj kvasinek bývají v moštích zastoupeny v dostatečném množství. Pouze mošty z přezrálých nebo hroznů napadených plísní šedou mají nedostatek thiaminu. Thiamin se přidává v množství 50 mg/hl. [8]

Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou vedlejší produkty kvašení. Pokud stoupne jejich obsah nad určitou hranici, zhoršuje se propustnost buněčné stěny kvasinek pro cukry a alkohol. Pro zlepšení průběhu kvašení se přidávají vyčištěné buněčné stěny odumřelých kvasinek, na které se mastné kyseliny poutají, a kvasný proces pak probíhá bez omezení. [8]

Tlak CO₂

Se zvyšujícím se tlakem CO₂ při kvašení v tlakových nádobách se proces zpomaluje. Při tlaku 7×10^5 Pa se pak kvašení zastaví. [8]

2.3.8 Biologické odbourávání kyselin

Biologické odbourávání kyselin, nazývané malolaktické kvašení neboli jablečno-mléčné kvašení, probíhá ve víně nejčastěji po skončení kvasného procesu, ale může probíhat i současně. Dochází ke snížení obsahu kyseliny jablečné ve víně působením mléčných bakterií. Kyselina jablečná je enzymaticky rozložena na méně výraznou kyselinu mléčnou a oxid uhličitý. Tento proces je žádoucí, protože dochází ke zmírnění kyselosti vína a tím ke zlepšení jeho kvality a ke zvýšení mikrobiální stability vína. Přílišným odbouráním kyselin ztrácí víno svěžest. Obsah kyseliny jablečné se doporučuje snižovat spíše scelením s vínem, které obsahuje kyseliny jablečné méně.

Pro rozvoj mléčných bakterií je důležitá teplota 14 – 18 °C, nízký obsah volné i vázané kyseliny siřičité a dostatečné množství dusíkatých látek. K řízenému biologickému odbourávání kyselin se používají bakterie druhu *Oenococcus oeni* a druhy, které jsou odolné vůči nízkému pH (<3,5) a vysoké koncentraci ethanolu (>10 obj. %) a SO₂ (50 mg/l).

Nekontrolované jablečno-mléčné kvašení může vést ke vzniku nežádoucích látek, které negativně ovlivňují kvalitu vína (kyselina octová) nebo mohou být nebezpečné pro lidské zdraví (biogenní aminy). [5, 15, 17]

2.3.9 Školení vína

Školení vína se provádí před plněním do lahví. Zahrnuje mnoho operací, z nichž nejdůležitější jsou čiření a filtrace. [12]

2.3.9.1 Čiření vína

Čiření vína se provádí z důvodu urychlení sedimentace kalických látek přidáním čiridel. Zákaly vína způsobují pevná kalící tělíška a chemické reakce probíhající při zrání vína. Koloidy mají buď záporný, nebo kladný náboj. Do vína se přidá látka s opačným nábojem, to způsobí vznik koloidních shluků, které s sebou při sedání ke dnu strhávají nečistoty a mikroorganismy. Čiřidla s kladným nábojem jsou želatina, vaječný bílek, mléko a kasein. Čiřidla se záporným nábojem jsou tanin, agar, bentonit, kyselina křemičitá, křemelina a kaolin. Pro čiření bílých vín se používá hlavně kasein, mléko a bentonit. [8,15]

2.3.9.2 Filtrace vína

Cílem filtrace je oddělení pevných částic přítomných ve víně, aniž by došlo k úpravám nebo změnám chemického složení a změně aromatických a chuťových vlastností vína. Kvalita filtrace závisí na druhu filtračního materiálu a velikosti jeho pórů. Podle velikosti kalových částic se rozlišuje hrubá a jemná filtrace. Nejčastěji se používají křemelinové filtry, dále deskové filtry a membránové filtrace. Aby byla zajištěna úplná čistota a mikrobiální stabilita hotového vína, je třeba filtraci několikrát opakovat. [8, 13]

2.3.10 Lahvování vína

Než je víno uvedeno do oběhu, je povinností výrobce umožnit Státní zemědělské a potravinářské inspekci odebrat vzorky k ohodnocení a vydání povolení o zařazení vyrobeného vína. Následuje stáčení vína do lahví. Víno musí být patřičně vyčeřené a stabilizované a celé lahvování musí proběhnout za omezeného přístupu vzduchu. Víno by před lahvováním mělo obsahovat přibližně 30 mg/l volného SO₂ a asi 7 g veškerých kyselin. Pokud je víno určeno k archivaci, je lepší vyšší koncentrace kyselin. Běžně se vína skladují 2 – 3 roky, poté víno a stárne a postupně ztrácí svůj odrůdový charakter.

Víno se plní do skleněných lahví o obsahu nejčastěji, 0,75 a 1 l, tmavozelené, hnědé barvy, nebo do bezbarvých lahví. Konzumní vína je možné plnit do obalů Tetra Pak či pet lahví. Malé objemy vín se plní hadičkou, větší objemy se plní jehlovým, zvonkovým a revolverovým stáčecím zařízením. Naplněné láhve se zátkují korkovými nebo plastovými zátkami, konzumní vína se uzavírají korunkami nebo plastovými uzávěry. [25]

2.4 Kvasinky

Kvasinky jsou eukaryotní, heterotrofní mikroorganismy, patřící mezi houby (*Fungi*). Pojmenování kvasinky vzniklo od schopnosti zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy a trisacharidy na oxid uhličitý a ethanol. [26]

2.4.1 Morfologie

Kvasinky jsou tvarově značně rozmanité (viz obrázek 5). Tvar a velikost buněk do určité míry ovlivňuje stáří buněk a podmínky kultivace. Při kultivaci kvasinek za aerobních podmínek jsou buňky kvasinek protáhlejší než při kultivaci za anaerobních podmínek. Tvar buňky může být elipsoidní, případně vejčitý až kulovitý, některé buňky jsou citronovitého, trojúhelníkovitého nebo válcovitého tvaru. Velikost buněk se pohybuje v rozmezí 3 – 6 μm . [26,27]

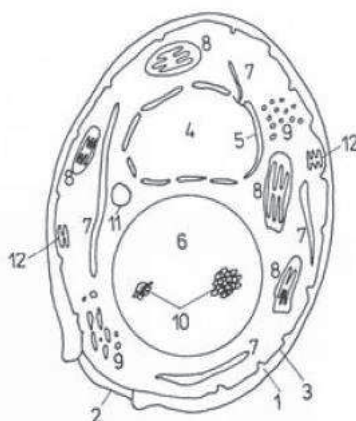


Obrázek 5: Tvary buněk kvasinek [28]

a – kulatý; b – oválný, elipsoidní; c – citronovitý; d – ogivální; e – lahvovitý, f – podlouhlý; g – vláknitý

2.4.2 Cytologie

Jak můžeme vidět na obrázku 6, vegetativní kvasinková buňka se skládá z buněčné stěny, cytoplazmatické membrány, cytoplazmy, která obsahuje řadu membránových struktur. Buňka obsahuje jádro, které je od cytoplazmy oddělené dvojitou jadernou membránou. Pohybové orgány bičíky vegetativní buňky kvasinek nemají. Některé rody kvasinek tvoří pohlavní spory. [26]



Obrázek 6: Schéma průřezu buňkou kvasinky [26]

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

2.4.2.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna kvasinek má silnou a pevnou strukturu. Dává buňce tvar a chrání ji před mechanickým poškozením a osmotickým šokem. Buněčná stěna obsahuje póry, kterými mohou procházet všechny sloučeniny mimo sloučeniny vysokomolekulární. Hlavní složkou buněčné stěny jsou polysacharidy (glukany, mannany, glukosamin, chitin). Polysacharidy mají strukturu vláken, tvoří hustou, pevnou spleť, která je vyplněna bílkoviny. Stěna obsahuje malé množství lipidů, fosfolipidů a fosforečnanů. Na povrchu stěny jsou patrné jizvy po pučení. Na jednom pólu každé buňky se nachází jizva zrodu, která zůstala v místě původního spojení buňky s mateřskou buňkou. Některé druhy kvasinek mají kolem buněk polysacharidové obaly – pouzdra. [26]

2.4.2.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána kvasinek silná 7,5 – 8 nm, skládá se z lipidů a proteinů a tvoří vychlípeniny vybíhající do cytoplazmy. Je volně propustná pro malé molekuly bez náboje a tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Cytoplazmatická membrána je sídlem transportních mechanismů, umožňujících příjem látek buňkou a transport látek z buňky do prostředí. [26]

2.4.2.3 Cytoplazma

Cytoplazma je průhledná homogenní hmota, obsahující řadu organel. Kromě strukturních útvarů se v cytoplazmě nachází zrníčka volutinu a glykogenu, dále ribozomy, ribonukleové kyseliny, enzymy, anorganické ionty, meziproducty metabolismu atd. U některých rodů kvasinek se v cytoplazmě vyskytuje tuk. [26, 28]

Cytoplazma kvasinek obsahuje systém dvojité membrány zvané endoplazmatické retikulum, na jehož povrchu jsou ribozomy, kde dochází k syntéze bílkovin. Endoplazmatické retikulum obsahuje enzymy a rezervní látky.

V cytoplazmě jsou přítomny mitochondrie, sídlo dýchacích enzymů a systému oxidační fosforylace. Mitochondrie jsou široké 0,3 – 1 μm , dlouhé až 3 μm a mohou být kulovitého válcovitého, vláknitého nebo laločnatého tvaru. Jsou složeny z bílkovin, lipidů a fosfolipidů, obsahují RNA a DNA. Mitochondrie jsou obklopeny vnější a vnitřní membránou. Vnitřní membrána tvoří vchlípeniny dovnitř mitochondrie – krysty.

Vakuola je kulovitý útvar obklopený jednou membránou. Mladé nebo pučící buňky obsahují několik menších vakuol, starší buňky obsahují jednu vakuolu, která může vyplnit téměř celý prostor buňky. Vakuola obsahuje hydrolytické enzymy, polyfosfáty, draselné ionty, aminokyseliny a puriny.

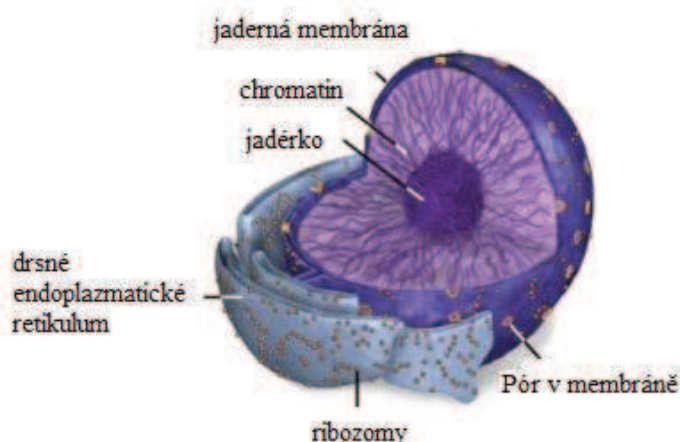
Cytoplazma dále obsahuje Golgiho aparát, jehož funkcí je transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. Golgiho aparát má tvar plochého měchýřku nebo několika propojených měchýřků uložených rovnoběžně vedle sebe.

Buňka kvasinky obsahuje síť proteinových vláken cytoskelet, která se vyskytuje jak v cytoplazmě, tak i v jádře. Cytoskelet umožňuje pohyb organel. [26]

2.4.2.4 Jádro

Jádro (viz obrázek 7) je často kulovitého tvaru o průměru 1,5 μm . Jádro kvasinek je obaleno dvojitou pórovitou membránou, která ho odděluje od cytoplazmy. Těsně pod

membránou je uložené jadérko srpkovitého tvaru. Jádro obsahuje pólóvé tělísko vřetenka, ze kterého vycházejí vlákna mikrotubuly. Mikrotubuly a tělísko plní důležitou úlohu při dělení jádra během rozmnožování. [15]



Obrázek 7: Jádro eukaryotické buňky [29]

Jádro je centrální organelou, která nese genetickou informaci nezbytnou pro dělení a život buňky. Genetická informace je zakódována sekvencí bází molekul DNA, které tvoří určitý počet chromozomů charakteristický pro každý druh. Chromozomy obsahují chromatin, který se skládá z histonů.

U Saccharomyces cerevisiae bylo zjištěno 16 chromozomů v haploidním jádře. [26, 30]

2.4.3 Chemické složení kvasinkové buňky

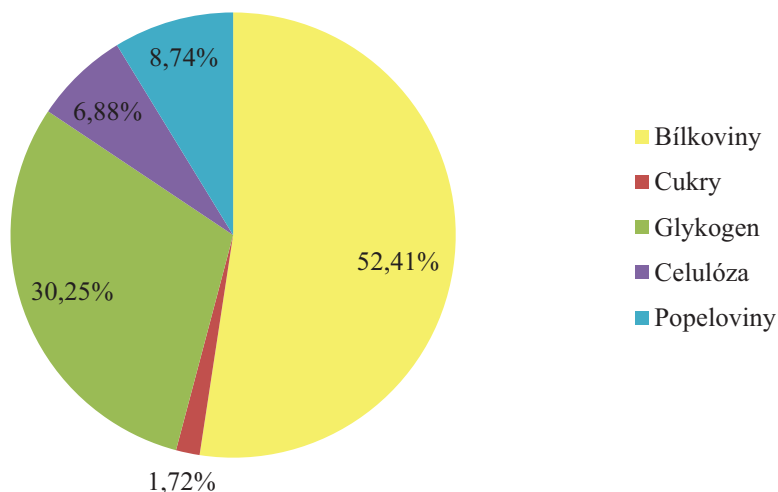
Chemické složení kvasinkové buňky je podobné složení rostlinné nebo živočišné buňky. 70 – 90 % hmotnosti kvasinek tvoří voda. Obsah vody a ostatních látek se liší v závislosti na druhu a stáří, na podmínkách ve kterých se kvasinky rozmnožovaly. Na změnu složení má vliv i změna nativního stavu kvasinek fyzikálním nebo chemickým zásahem. Přehled nejdůležitějších látek v buňce je uveden v tabulce 2. [28]

Tabulka 2: Přehled nejdůležitějších látek v kvasinkové buňce [28]

Nízkomolekulární látky	Vysokomolekulární látky	Komplexy
Puriny a pyrimidiny	nukleové kyseliny	nukleoproteiny
Aminokyseliny	bílkoviny	
Monosacharidy	polysacharidy	glykoproteiny
Lipidy a jejich složky		lipoproteiny
Vitaminy, steroly		enzymy
Hormony		
Voda		

Jak je vidět v grafu 1 složení sušiny kvasinek, kvasinky obsahují velké množství bílkovin. Z tohoto důvodu jsou využívány jako krmivo. Buňky kvasinek obsahují zejména aminokyseliny arginin, alanin, asparagin, glutamin, leucin a lysin. Hlavními sacharidy kvasinkových buněk jsou polysacharidy škrob, glykogen, celulóza, dále glykogen, který

slouží jako rezervní látka. Lipidy jsou zastoupeny ve formě tuků, vosků, fosfatidů, steroidů a jejich štěpných produktů, zejména mastnými kyselinami a glycerolem. Nejvíce zastoupenými popelovinami jsou oxid fosforečný a oxid draselný, které mají uplatnění při fermentačních pochodech. Kvasinkové buňky obsahují řadu vitaminů, zejména komplex vitaminů B a provitamin D. [15, 31]



Graf 1: Složení sušiny kvasinek [31]

2.4.4 Rozmnožování kvasinek

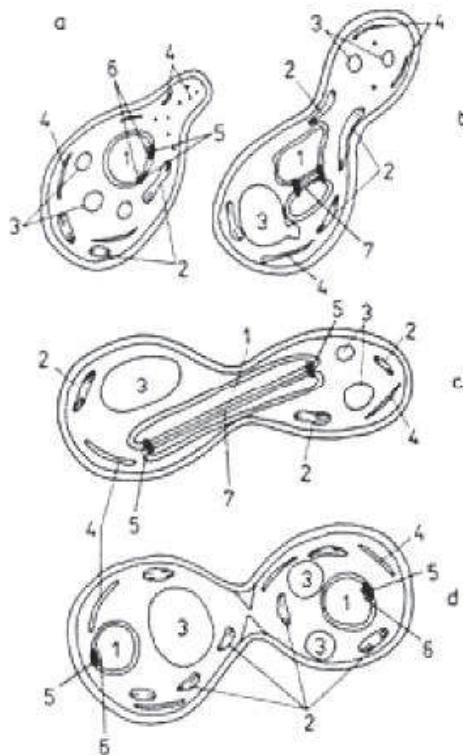
Rozmnožování kvasinek může probíhat pohlavně nebo nepohlavně. Nepohlavně, neboli vegetativně, se kvasinky rozmnožují pučením. U některých rodů či kmenů kvasinek se vytváří pseudomycelium, u některých pravé mycelium. Tvorba pseudomycelia a pravého mycelia je charakteristická pro rody *Endomycopsis* a *Sporobolomyces*. Kvasinky rodu *Saccharomyces*, se rozmnožují dělením. Přechodem mezi pučením a dělením je pučení na široké základně, které je typické pro kvasinky rodu *Saccharomyces*. Pohlavně se kvasinky rozmnožují pomocí spor. Kvasinky tvoří buď askospory a jsou řazeny mezi *Ascomycotina* nebo bazidiospory a jsou řazeny mezi *Basidiomycotina*. [26, 32]

2.4.4.1 Nepohlavní rozmnožování

Většina rodů kvasinek se nepohlavně rozmnožuje pučením, jehož schéma je zobrazeno na obrázku 8. Před vlastním pučením dochází ke splynutí membrán endoplazmatického retikula, k jeho následnému dělení a k opakovanému dělení vakuol (obr. 8 a). Dále dochází k protažení mitochondrií (obr. 8 b). Jakmile se začne vytvářet pupen, začnou do něj migrovat vakuoly a mitochondrie (obr. 8 b). Zároveň začne mitotické dělení jádra (obr. 8 c). Mitóza se skládá z profáze, metafáze, anafáze a telofáze.

V profázi dochází ke zkrácení chromozomů, rozpuštění jaderné blány a ke vzniku dělicího vřeténka. V metafázi se chromozomy svými centromerami seřadí do centrální roviny buňky. V anafázi se v místě centromery chromozomy podélně rozdělí a chromatidy jsou vlivem zkracování tubulů dělicího vřeténka přitahovány k opačným koncům buňky. V poslední fázi – telofázi zaniká dělicí vřeténko, chromozomy se protahují a vytváří se kolem nich jaderná blána. Uprostřed buňky se vytvoří přepážka a vzniknou tak dvě jádra.

Poté dochází k migraci jádra a ostatních složek cytoplazmy směrem k pupenu (obr. 8 d). Jakmile přejdou do pupenu ostatní složky cytoplazmy, kanálek mezi mateřskou a dceřinou buňkou se uzavře cytoplazmatickou membránou a v pupenu dojde k syntéze a rozšíření endoplazmatického retikula. Dále se vytvoří buněčná stěna mezi mateřskou a dceřinou buňkou, pupen zvětší svoji velikost, drobné vakuoly se spojí v jednu vakuolu, pučení je ukončeno a dojde k oddělení dceřiné a mateřské buňky. [26,33]



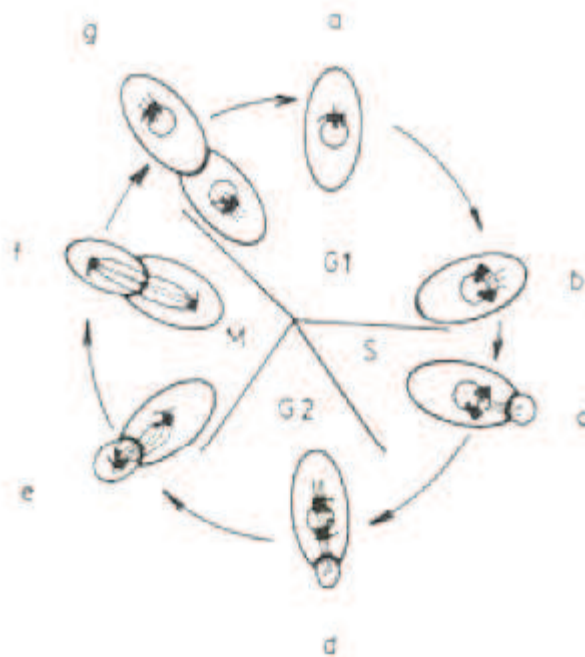
Obrázek 8: Schéma pučení kvasinek [26]

1 – jádro, 2 – mitochondrie, 3 – vakuola, 4 – endoplazmatické retikulum, 5 – pólové tělísko vřeténka, 6 – mikrotubuly, 7 – vřeténko

Celý cyklus rozmnožování trvá za optimálních podmínek asi 2 hodiny. Na obrázku 9 je znázorněn buněčný cyklus dělení *Saccharomyces cerevisiae*, který je možné rozdělit do 4 period:

- **G1- fáze** – v haploidní buňce je každý gen jenom jednou
- **S-fáze** – fáze syntézy chromozomální DNA a vytváření dvou chromatid z chromozomu
- **G2-fáze** – replikace chromozomální DNA je ukončena
- **M-fáze** – mitóza

Cyklus buněčného dělení *Saccharomyces cerevisiae* je kontrolován více než stovkou genů, přičemž některé z nich mají regulační funkci. Teplotně senzitivní mutanty těchto genů umožnily studium kontroly cyklu buněčného dělení a jeho regulace. Geny jsou označovány CDC (cell division cycle). [26]



Obrázek 9: Schéma cyklu buněčného dělení *Saccharomyces cerevisiae* [26]

S – syntéza DNA; *M* – mitóza; *G1* – v buňce je základní genetický materiál, tj. 1 genom; *a* – klidová buňka; *b* – zdvojení polárního tělíska; *c* – syntéza DNA; vznik malého pupenu; *d* – separace polárních tělísek a vznik vřeténka; *e, f* – migrace jádra do pupenu a dělení jádra; *g* – vznik dvou samostatných jader, oddělení buněk

2.4.4.2 Pohlavní rozmnožování

Pokud se zmenší množství živin a vody, rozmnožují se kvasinky pohlavně. Pohlavním rozmnožováním vznikají pohlavní spory. Většina kvasinek tvoří askospory, což jsou endospory, které jsou umístěny ve vřecku neboli asku. Kvasinky, které tvoří askospory, jsou řazeny mezi *Ascomycotina*. Některé rody kvasinek tvoří exospory, které jsou umístěny vně sporotvorných buněk a jsou řazeny mezi *Basidiomycotina*. [26]

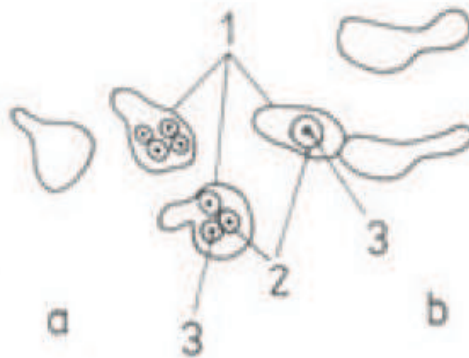
Během pohlavního rozmnožování dochází ke konjugaci dvou haploidních buněk a spájení jejich jader – karyogamie, za vzniku diploidního jádra. Diploidní jádro se poté dělí redukčním dělením – meiózou. Redukčním dělením vznikají 4 haploidní jádra, která a se buď dělí mitózou a pak vznikají spory, nebo vznikají spory rovnou. V životním cyklu kvasinek se pravidelně střídá haploidní a diploidní fáze buněk. [26]

Pokud dojde ke spájení dvou přibližně stejných buněk, jedná se o izogamní spájení (viz obrázek 10), které je typické pro kvasinky rodu *Sachcaromyces*. Dojde-li ke spájení různě velkých buněk, nastává heterogamní spájení (obrázek 11). K heterogamnímu spájení dochází u rodu *Debaryomyces*, kdy se spájí dceřiná buňka s mateřskou. [26]



Obrázek 10: Izogamní spájení [26]

a – změna tvaru buběk
b – vzniky zygoty
c – pučení zygoty



Obrázek 11: Heterogamní spájení [26]

a – *Debaryomyces*; *b* – *Nadsonia*
 1 – askus; 2 – askospory
 3 – tuk

2.4.5 Růstová křivka kvasinek

Rychlost pučení se posuzuje podle množství buněk, nebo podle hmotnosti hmoty, která vznikla z původního zaočkovaného množství v určitém čase a při daných podmínkách. Jinou možností je stanovení množství např. celkového dusíku, celkového fosforu a organického fosforu. Počet buněk se stanovuje v jednom ml kvasné tekutiny počítáním buněk v Bürkerově nebo Thomově počítací komůrce. Sestrojením grafu závislosti počtu buněk na čase dostaneme **růstovou křivku** (viz obrázek 12), která se skládá ze 4 základních fází: [34]

- **Lag fáze**

Délka lag fáze neboli latentní fáze je různá. Závisí na mnoha faktorech, jako je množství růstových látek v prostředí nebo množství a stáří očkované kultury. Během lag fáze se kvasinky nerozmnožují, ale adaptují se na podmínky prostředí.

- **Exponenciální fáze**

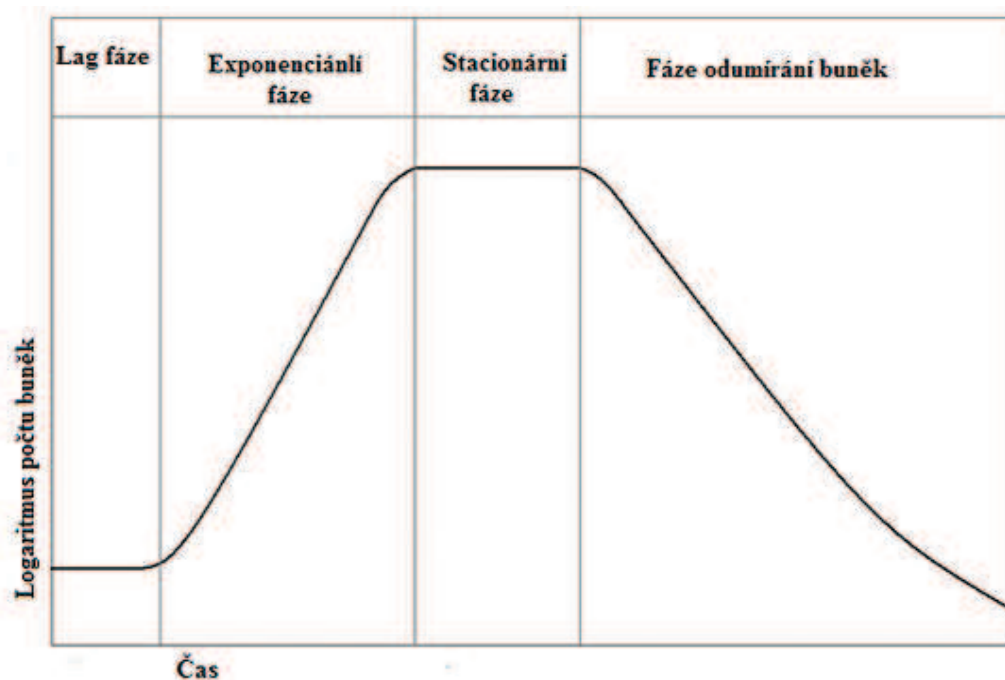
Během exponenciální fáze dochází k nejintenzivnějšímu množení kvasinek a tvorbě ethanolu. Koncentrace buněk se zvýší na 10^7 - 10^8 buněk/ml. Nejdůležitější roli hraje teplota, koncentrace amoniaku, aminokyselin, cukrů a přítomnost kyslíku. Fáze trvá 3 – 6 dní.

- **Stacionární fáze**

Stacionární fáze nastává po vyčerpání živin nebo při nahromadění metabolitů. Kvasinky se přestanou množit. Během stacionární fáze je počet buněk stabilní, nově vytvořené buňky nahrazují odumírající buňky. Fáze trvá 2 – 10 dní.

- **Fáze odumírání buněk**

Koncentrace kvasinek postupně klesá z důvodu vyčerpání živin nebo nahromadění metabolitů, zejména ethanolu. [17]



Obrázek 12: Růstová křivka [35]

2.4.6 Metabolismus kvasinek

Metabolismus je charakterizován přeměnou látek, která se odehrává v buňkách kvasinek a vlivem jejich činností i v prostředí, kde rostou a rozmnožují se. Metabolismus může mít anabolický nebo katabolický charakter. Při anabolismu dochází k biosyntéze látek a spotřebě energie, při katabolismu dochází k rozkladu látek a uvolnění energie. Většina mikroorganismů se vyznačuje vysokou plasticitou metabolismu tj. přizpůsobivostí vnějším podmínkám. Enzymové vybavení buňky je závislé na složení živného prostředí. [26, 28]

Kvasinky jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, proto u nich paralelně probíhají kvasné procesy s dýchacími. U vinných kvasinek převládá kvasný proces nad dýchacím. [34]

2.4.6.1 Ethanolové kvašení

Průmyslově nejvýznamnější metabolickou drahou kvasinek je ethanolové kvašení. Výchozím substrátem pro ethanolové kvašení jsou sacharidy, které jsou glykolýzou neboli Embden-Meyerhofovou metabolickou cestou přeměněny na pyruvát.

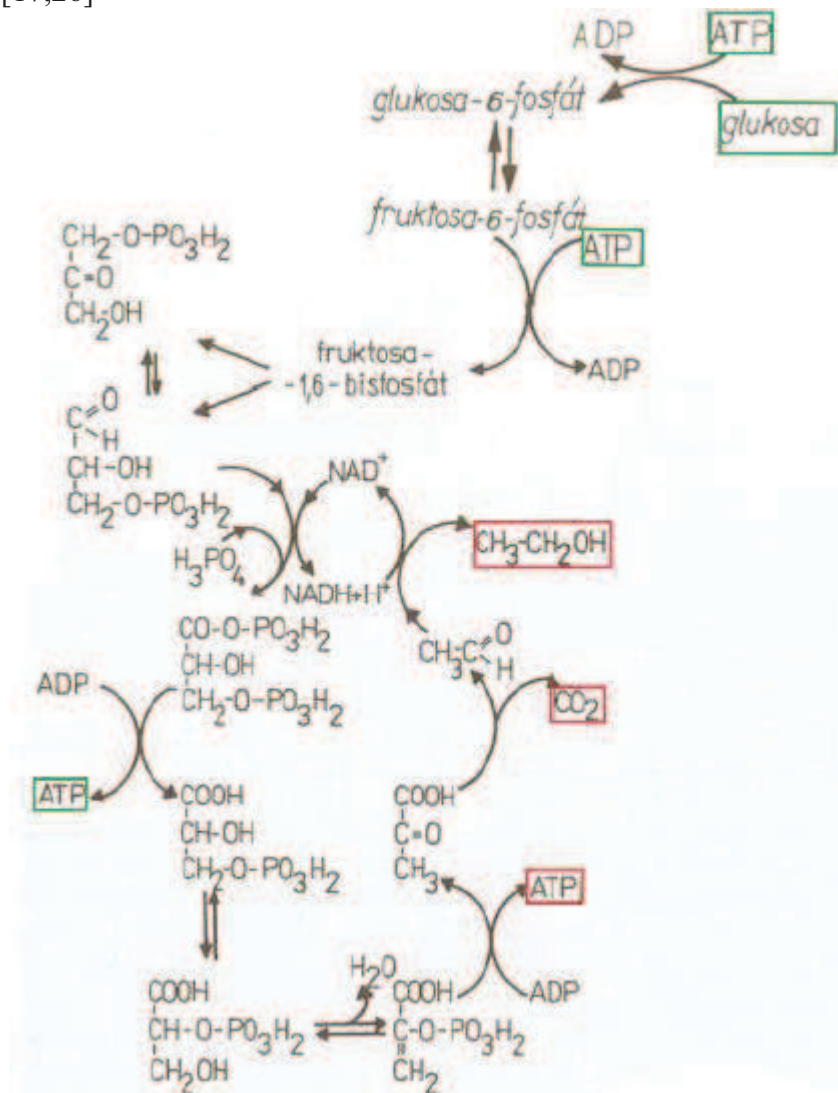
Glykolýza (viz obrázek 13) je základním anaerobním katabolickým procesem sacharolytických mikroorganismů, zahrnuje 11 chemických reakcí, které vedou k odbourání hexózy a uvolnění energie ve formě ATP. Nejprve je hexóza transportována do buňky usnadněnou difúzí. V první fázi glykolýzy dochází k fosforylaci glukózy a fruktózy skupinou enzymů hexokinázy, za vzniku glukózy-6-fosfátu a fruktózy-6-fosfátu. Touto reakcí se spotřebovává molekula ATP. Poté je glukóza-6-fosfát fosfogluózaizomerázou přeměněna na fruktózu-6-fosfát. V další fázi je fruktóza-6-fosfát opět fosforylována fosfofruktokinázou a vzniká fruktóza-1,6-difosfát a spotřebovává se jedna molekula ATP. Fruktóza-1,6-difosfát je štěpena aldolázou na dvě triózy, dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Dihydroxyacetonfosfát je v nadbytku a je fosfátizomerázou přeměněn na glyceraldehyd-3-fosfát, který je později štěpen glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázou na 1,3-difosfoglycerát. Zároveň dochází k redukci NAD^+ na NADH . Poslední fáze glykolýzy zahrnuje přeměnu 1,3-

difosfoglycerátu na 3-fosfoglycerát. Reakce je katalyzovaná fosfoglycerátkinázou a dochází k uvolnění energie, která je využita na fosforylaci ADP na ATP. Vzniká pyruvát, který je konečným produktem glykolýzy.

Z každé molekuly hexózy vznikají 2 molekuly pyruvátu, 4 ATP a 1 NADH. 2 ATP jsou spotřebovány na fosforylaci, čistý energetický zisk buňky je 2 ATP. Vzniklý pyruvát může být využitý v několika drahách, kvasinky musí regenerovat NAD^+ z NADH, což může být uskutečněno fermentací nebo respirací.

Alkoholová fermentace probíhá v cytoplazmě. Při fermentaci dochází k přeměně pyruvátu na ethanol a k regeneraci NAD^+ , spotřebovaného v glykolýze. Pyruvát je nejprve pyruvátdekarboxylázou dekarboxylován na acetaldehyd. V průběhu dekarboxylace dochází k uvolnění molekuly CO_2 . Poté je acetaldehyd redukován účinkem NADH a alkoholdehydrogenázy na ethanol. Enzym pyruvátdekarboxyláza potřebuje ke své činnosti kofaktor hořčík a thiamin, alkoholdehydrogenáza potřebuje jako kofaktor zinek.

Produkty alkoholové fermentace, ethanol a oxid uhličitý, jsou z buněk transportovány prostou difúzí. [17,26]



Obrázek 13: Schéma glykolýzy s následným ethanolovým kvašením [26]

2.4.6.2 Glycerolpyruvátová fermentace

Alternativní cestou k regeneraci NAD⁺ je glycerolpyruvátová fermentace, jejíž konečným produktem je glycerol.

Pokud probíhá fermentace v přítomnosti siřičitanů, siřičitany se váží s acetaldehydem, což brání regeneraci NAD⁺ alkoholdehydrogenázou. Aby kvasinky kompenzovaly deficit NAD⁺, musí oxidovat NADH produkcí glycerolu.

Dihydroxyacetonfosfát je oxidován na glycerol-3-fosfát enzymem glycerol-3-fosfát-dehydrogenáza, za současné oxidace molekuly NADH na NAD⁺. Glycerol-3-fosfát je pak glycerol-3-fosfát-fosfatázou defosforylován na glycerol. Reakcí se spotřebovává 1 ATP [17].

Glycerolpyruvátová fermentace může probíhat i na začátku kvasného procesu, kdy kvasinky potřebují k růstu velké množství substrátu. Rozmnožování buněk obnáší biosyntézu lipidů, proteinů, nukleotidů atd., která vychází z pyruvátu. Pokud je pyruvát využíván v anabolickém procesu, dochází k regeneraci NAD⁺ glycerolpyruvátovou cestou. [17]

2.4.7 Taxonomie kvasinek

Mikroorganismy jsou podle určitých znaků rozděleny do různých systémových jednotek, tzv. taxonů [32].

Kvasinky jsou zařazeny do těchto taxonů:

Super rengum (nadříše): *Eukaryota*

Rengum (říše): *Fungi*

Divisio (oddělení): *Eumycota*

Classe (třída): *Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes* [32]

2.4.7.1 Třída *Ascomycetes*

Kvasinky patřící do třídy *Ascomycetes* tvoří endospory a mycelia bez přepážek. Kvasinky neprodukují ureázu a zkvašují sacharidy. Buněčná stěna je trojvrstvá a skládá se zejména z glukanu a mananu.

Taxonomické rozdělení:

- Kvasinky dělí se příhrádkami a kvasinkovité organismy s pravým myceliem.
 - Kvasinky s koherentním myceliem (např. rod *Yarrowia*)
 - Kvasinky s jehlicovitými sporami (např. rod *Ashbya*)
 - Kvasinkovité mikroorganismy s dizartikulovaným myceliem (např. rod *Schizosaccharomyces*)
- Jednobuněčné pučící kvasinky
 - Apikulátní kvasinky čeledě *Sacharomycodaceae* (např. rod *Kloeckera*)
 - Lipidotvorné kvasinky čeledě *Lipomycetaceae* (např. rod *Lipomyces*)
 - Kvasinky čeledě *Sacharomycetaceae*
 - Kožotvorné kvasinky (např. rod *Pichia*)
 - Jednobuněčné, sedimentující, zkvašující kvasinky (rod *Saccharomyces*)
 - Malé rody askogenních kvasinek (např. rod *Clavispora*)
 - Skupina anamorfních forem askogenních kvasinek (např. rod *Candida*) [32]

2.4.7.2 Třída *Basidiomycetes*

Kvasinky třídy *Basidiomycetes* vytvářejí basidiospory (exospory), produkují ureázu a nezkrvají sacharidy. Buněčná stěna je tvořena chitinem, mananem, xylózou a fukózou.

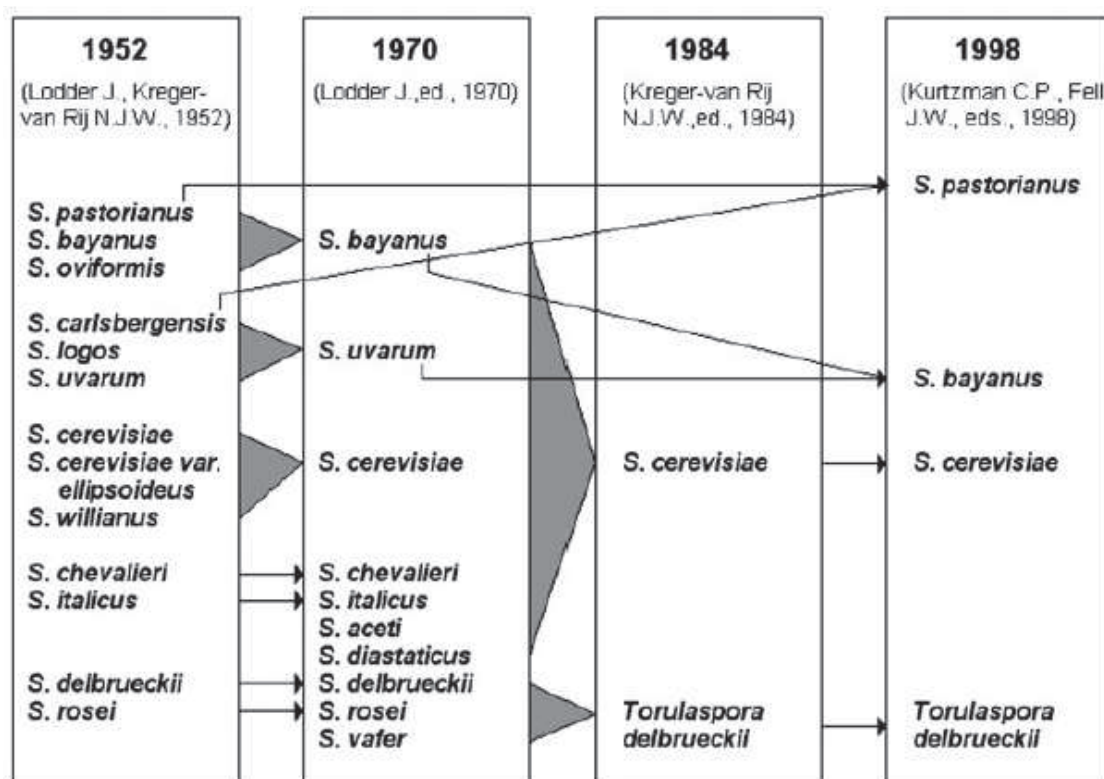
Taxonomické rozdělení:

- Červené kvasinkovité organismy (např. rod *Rhodotorula*)
- Krémové, pleťové, světlžluté druhy (např. rod *Cryptococcus*)
- Černé kvasinkovité organismy (např. rod *Aureobasidium*)
- Kvasinky pučící ve sterigmách (např. rod *Sterigmatomyces*)
- Sněťovité organismy
- Slizovité basidiomycetové organismy (rod *Apiotrichum*)
- Slizovité kvasinkovité organismy rodu *Candida* [32]

Třída *Deuteromycetes* je pomocnou třídou, u které není známa tvorba pohlavních spor. [32]

2.4.8 Rod *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* je největší a nejdůležitější rod třídy *Ascomycetes*. Mnoho kvasinek rodu *Saccharomyces* se hojně využívá v kvasném průmyslu. Historie taxonomie sahá až do roku 1838, kdy německý biolog Julius Meyen zavedl rod *Saccharomyces*, což byla tehdy jedna z prvních objevených kvasinek. Jak můžeme vidět na obrázku 14, taxonomie rodu *Saccharomyces* zaznamenala v posledních desetiletích mnohé změny. [37, 38]



Obrázek 14: Vývoj taxonomie průmyslově významných kvasinek [39]

Se zavedením molekulárních metod se změnila i klasifikační schémata. V současné době jsou rozlišovány v rámci rodu *Saccharomyces* 2 druhové skupiny: [37]

Komplex *Saccharomyces sensu stricto*

Komplex zahrnuje druhy využívané zejména v kvasných technologiích, a to *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces pastorianus*, dále druhy *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae* a *Saccharomyces paradoxus*.

Do druhu *Saccharomyces bayanus* se řadí kmeny vinařských kvasinek spolu s kontaminanty hroznového moštu. *Saccharomyces pastorianus* jsou spodní pivovarské kvasinky, *Saccharomyces cerevisiae* vrchní pivovarské kvasinky. Druh *Saccharomyces cerevisiae* dále zahrnuje pekařské, lihovarské a vinařské kvasinky a kmeny využívané pro výrobu saké. Druhy *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus* a *Saccharomyces pastorianus* lze od sebe navzájem spolehlivě odlišit metodami analýzy nukleových kyselin. [37]

Komplex *Saccharomyces sensu lato*

Komplex *Saccharomyces sensu lato* zahrnuje druhy *Saccharomyces dairensis*, *Saccharomyces castelli*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces servazzii* a *Saccharomyces unisporus*, které nemají význam pro fermentační technologie. [39, 40]

- ***Saccharomyces cerevisiae***

Saccharomyces cerevisiae se uplatňuje jako pekařská, lihovarská, spodní či vrchní pivovarská a vinařská kvasinka. Buňky jsou oválného, elipsovitého až protáhlého tvaru o rozměrech 3,5 – 7 x 4,5 – 11 µm. Na sporulačních půdách tvoří kulaté hladké spory, které jsou v asku charakteristicky uspořádané do tvaru tetraedru. Může tvořit stromečkovitě větvené pseudomycélium. Asimiluje a zkvašuje glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a částečně rafinózu. Neasimiluje laktózu a dusičnan. Druh *Saccharomyces cerevisiae* je glukofilní druh kvasinek a pro výrobu vína je nepostradatelný. Je nejčastější součástí mikroflóry kvasících moštů a mladých vín, je charakteristický vysokou tolerancí k ethanolu a osmotolerancí. Využívají se jako čisté kultury vinných kvasinek. [26,32]

- ***Saccharomyces bayanus***

Kvasinky *Saccharomyces bayanus* bývají spojovány se spontánním kvašením moštu. Buňky jsou elipsoidního, kulovitého a někdy protáhlého tvaru, 7 – 8 µm dlouhé. Vegetativní buňky se mění přímo na asky. V asku diploidních kmenů jsou 1 – 4 spory. *Saccharomyces bayanus* zkvašuje glukózu a rafinózu, částečně galaktózu, maltózu, sacharózu, trehalózu a melibiózu, je schopný fermentace i při nízkých teplotách. Buňky jsou charakteristické tolerancí k vyšší koncentraci ethanolu, SO₂ a glukózy.

Saccharomyces bayanus je velmi podobný *Saccharomyces cerevisiae* a jejich rozlišení pouze na základě fyziologických testů není dostatečné. Spolehlivě je možné tyto druhy rozlišit použitím metod molekulární biologie. [5, 32, 41]

2.4.9 Vinařské kvasinky

Současná taxonomie uvádí přibližně 1000 druhů hub skupiny *Zygomycetes*, 55000 druhů hub skupiny *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* a *Deuteromycetes*. Z toho je 600 druhů kvasinek,

příčemž s technologií výroby a ošetřování vína jich souvisí přibližně 20, např. druhy *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Schizocachcaromyces*, *Zygosacharomyces*. [6,42]

Kvasinky, které se podílejí na kvašení moštu, vegetují už na povrchu bobulí dozrávajících hroznů, ze kterých přecházejí ve formě spor do moštu. Na jedné bobuli se nachází asi 8 milionů buněk, na prasklé asi 40krát více než na nepoškozené. Dalším zdrojem kvasinek je půda, ze které se kvasinky dostávají pomocí deště, kdy se kapky vody odrážejí od půdy a dopravují je na bobule. Vývoj kvasinek podporuje kyselé prostředí a dostatek kyslíku. V podmínkách, které převládají při přípravě vína, se kvasinky rozmnožují pučením. Tento proces se může opakovat asi 35krát. Po každém pučení na povrchu kvasinky zůstává jizva, na které dochází ke snížení intenzity látkové výměny. Déle používané kvasinky, které mají již řadu jizev, mají nižší kvasný výkon. Činnost kvasinek zeslabuje zvýšení teploty při kvašení, vysoký obsah cukru a alkoholu. Některé kmeny kvasinek je možné adaptovat na vyšší odolnost k alkoholu a oxidu siřičitého. Příkladem jsou sulfitové kvasinky, které se používají k rozkvašení silněji zasařených moštů. [6, 42]

Na začátku kvasného procesu je v moštu přítomno několik druhů kvasinek, jejichž spektrum závisí na faktorech, jako je odrůda hroznů, fáze zralosti při sklizni, použití přípravku proti plísním, klimatické podmínky, rozvoj hnilob atd. Konečné zastoupení kvasinek ovlivňuje veškerý kontakt hroznů a moštu při sklizni a transportu a zejména technologické postupy ve vinařství.

Z vinice přichází 1 – 3 % požadovaných kvasinek. Podle kvasného výkonu a vzhledu se rozlišují kvasinky apikulátní, ušlechtilé a křísotvorné kvasinky. [6, 42]

2.4.9.1 Křísotvorné kvasinky

Křísotvorné kvasinky se množí zejména na hladině vína s nízkým obsahem alkoholu (11 % obj.). Schopnost povrchového růstu buněk je spojena s příznivými podmínkami aerobiózy. Jejich působením dochází k oxidaci ethanolu na acetaldehyd a vzniku šedobílé kožky plující na hladině vína. Zároveň se vyvíjí ostrý zápach a škrabavá chuť vína. [6, 43]

Představitelem křísotvorných kvasinek je např. *Pichia membranaefaciens*. Buňky jsou elipsoidního tvaru, je pro ně charakteristické multipolární pučení a tvoří stromčkovité mycelium. Velikost buněk je 3 – 4,5 x 4,12 – 10 µm. Tento druh zkvašuje glukózu, asimiluje xylózu a organické kyseliny. *P. membranaefaciens* se vyskytuje v kysaném zelí, kvašených okurkách a způsobuje křísotvení vína.

Dalšími zástupci jsou např. *Candida vini*, *Pichia fermentans* a *Hansenula anomala*. [32, 43]

2.4.9.2 Apikulátní kvasinky

Kvasinky se přirozeně nacházejí v moštu a jsou označovány jako „divoké kvasinky“. Na počátku kvasného procesu mají 1000krát vyšší zastoupení než *Saccharomyces cerevisiae* a zahajují kvašení. Nejvýznamnějšími zástupci jsou:

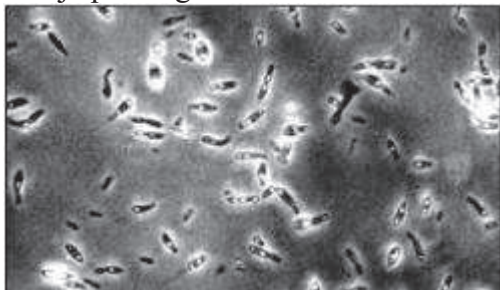
- *Kloeckera apiculata* (viz obr 15)

Pohlavním stádiem *Kloeckera apiculata* je *Hanseniaspora*. Buňky mají protáhlý nebo citronový tvar, pučí bipolárně. Velikost buněk je 1,5 – 4 x 3 – 10 µm. *Kloeckera apiculata*

může tvořit pseudomycelium, primitivní nebo dobře rozvinuté. Zkvašovat dokáže pouze glukózu [44].

- *Metchnikowia pulcherrima* (viz obr. 16)

Buňky kvasinek mají kulaté nebo elipsovité buňky o rozměrech 2 – 9 x 2 – 16 μm a ve sladině tvoří chlamydospory. Typická je tvorba červenohnědého barviva pulcherimin. Zkvašuje pouze glukózu.



Obrázek 15: *Kloeckera apikulata*[44]



Obrázek 16: *Metchnikowia pulcherrima* [44]

Dalšími apikulátními druhy jsou *Candida*, *Pichia*, *Issatchenkia* a *Kluyveromyces*.

Divoké kvasinky mají širokou enzymatickou výbavu. Glukosidázy, esterázy, lipoxázy, proteázy, pektinázy a glukanázy působí na složky hroznů a moštu a podílejí se na aromatických vlastnostech vznikajícího vína. Kvasinky rychle spotřebovávají esenciální dusíkaté látky a růstové faktory v moštu a jako vedlejší produkt produkují glycerol a kyselinu octovou. Vyznačují se nízkou snášenlivostí alkoholu. Od 3 – 4 % obj. alkoholu činnost kvasinek ustává. V tomto okamžiku se začínají podílet na kvašení hlavně druhy *Saccharomyces*. [6, 21, 44]

2.4.9.3 Ušlechtilé kvasinky

Ušlechtilé vinné kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* (viz kapitola 2.4.8) jsou na počátku spontánního kvasného procesu zastoupeny ve velmi malém množství. Stávají se dominantní se zvyšující se koncentrací alkoholu, kdy ustává činnost apikulátních kvasinek. Vytváří velké množství alkoholu a pozitivních vedlejších produktů.

V současnosti se běžně používají čisté kultury kvasinek a je kladen důraz na rychlé zakvašení, bezproblémové prokvašení, kvašení v širokém spektru teplot, nízkou pěnovitost, dobrou výtěžnost alkoholu, nulovou tvorbu oxidu siřičitého a látek ztěžující filtraci, snášenlivost cukru a alkoholu, rychlou sedimentaci po prokvašení, šetnost k barvě červených vín, žádné ovlivnění odrůdového charakteru a způsobu vyzrání. [6]

2.5 Identifikace a charakterizace kvasinek

Kvasinky je možno identifikovat podle jejich morfologických fyziologických a biochemických vlastností. Vyšší taxonomické skupiny jako jsou třídy a čeledi a rody je možné určit podle morfologických vlastností. Fyziologické a biochemické vlastnosti umožňují identifikovat druhy kvasinek a jejich varianty. Při identifikaci kvasinek se nejprve pod mikroskopem pozoruje čistá kultura. Popíše se tvar, velikost, způsob vegetativního rozmnožování a schopnost tvořit spory a pseudomycelium. Dále se pozoruje schopnost kultury tvořit mázdu na tekutém prostředí a schopnost zkvašovat a asimilovat jednotlivé

diagnostické cukry. Poté se zkoumá asimilace dusičnanů, ethanolu, tuků a provádí se další testy, kterými se kvasinky rozlišují. [27, 45]

V této kapitole budou popsány zejména ty testy, které byly použity v praktické části práce.

2.5.1 Tolerance vůči alkoholu

Ve vinařství je důležité testování účinku ethanolu v prostředí na přítomný mikroorganismus. Pro zjištění tolerance kvasinek vůči alkoholu se jako médium používá sladina nebo sladinový agar, do kterých se těsně před zaočokováním přidává 1, 4, 8, 12, 16 a 18 % ethanolu. Nejčastěji kvasinky snášejí koncentrace 4, 8 až 12 % ethanolu. Některé kmeny snášejí až 18 % ethanolu např. *Sacharomyces oviformis*. [46]

2.5.2 Osmotolerance

Kvasinky, které snášejí vyšší koncentrace sacharidů, se označují jako osmotolerantní (resp. osmofilní). Mezi osmofilní kvasinky patří např. *Sacharomyces rouxii*, *Saccharomyces bailii* var. *bailii* a *Sacharomyces bailii* var. *osmophilus*. Tolerance vůči vysokým koncentracím sacharidů se posuzuje porovnáním růstu kvasinek v prostředích a různé koncentraci glukózy, např. 10 % a 50 %. [46]

2.5.3 Důkaz ureázy

Test na důkaz ureázy se používá na rozlišení kvasinek tříd *Ascomycetes* a *Basidiomycetes*. Ureáza je intracelulární enzym basidiomycet a mnohých bakterií. Kvasinky, které tento enzym produkují, štěpí močovinu za uvolnění aminoskupiny, která je využitelná pro výstavbu bílkovin. Reakce je detekována změnou barvy indikátoru (fenolová červeně). Pozitivní reakce dává červené zbarvení reakční směsi, které se objeví v důsledku alkalické reakce způsobené uvolňováním amoniaku. [46]

2.5.4 Zkvašování sacharidů

Klíčovým k určení jednotlivých druhů rodu *Saccharomyces* je zkvašování sacharidů. Podle toho, které sacharidy zkvašují, můžeme druhy rozdělit na 4 kvasné typy. Toto rozdělení je zjednodušené a umožňuje rozdělit rod na menší celky, ve kterých se kultury liší podle způsobu kvašení dalších cukrů. Druh *Saccharomyces cerevisiae* zkvašuje maltózu i sacharózu, jedná se teda o kvasný typ II. [34]

Tabulka 3: Kvasné typy rodu *Saccharomyces* [46]

Typ I		Typ II		Typ III		Typ IV	
maltóza	sacharóza	maltóza	sacharóza	maltóza	sacharóza	maltóza	sacharóza
+	-	+	+	-	+	-	-

Kvašení sacharidů se řídí těmito pravidly Kluyver-Stelling-Dekkerové:

- Pokud kmen nezkvašuje glukózu, nezkvašuje žádný jiný sacharid.
- Pokud kmen kvasí glukózu, zkvašuje i manózu, fruktózu a může zkvašovat i oligosacharidy.
- Kmen, který zkvašuje glukózu, nezkvašuje laktózu a obráceně. [46]

2.5.5 Důkaz killerové aktivity

Některé mutanty kvasinek jsou schopné usmrcovat citlivé kmeny stejného nebo příbuzného druhu jednoho rodu. Tyto kmeny uvolňují toxin, kterým citlivé kmeny zabíjejí. Buňky s touto schopností produkují dva druhy dvouvláknové RNA (dsRNA) s různou molekulovou hmotností, které se označují M a L. M-RNA se využívá jak na produkci toxinu, tak i na obranu proti němu. L-RNA má schopnost kódovat bílkovinu pouzdra, ve kterém se RNA nachází. Killerovou bílkovinu váže bentonit nebo se sráží za přítomnosti taninu při teplotě nad 32 °C. [46]

Smrtící kmeny se dokazují na živné půdě YPED, která obsahuje 0,3 % kvasničného extraktu, 1 % g peptonu, 0,5 % glukózy a 2 % agaru. Půda YPED o pH 4,5 a s přísadkou methylenové modři se plní do zkumavek a citlivé kmeny se do ní zamíchají v takovém množství, aby výsledná koncentrace byla $5 \cdot 10^5$ buněk v 1 ml. Agar se suspenzí buněk se vlévá do Petriho misek a po ztuhnutí se na povrch očkovací kličkou nanáší smrtící kmeny. Inkubace trvá dva dny při teplotě 22 °C. Okolo nátěru smrtících kmenů se vytvoří jasná zóna a mrtvé buňky se zbarví modře. [46]

2.5.6 Identifikace metodami molekulární biologie

Klasické identifikační metody mohou mít v některých případech nízkou citlivost nebo mohou mít omezené možnosti identifikovat špatně kultivovatelné mikroorganismy.

Metody molekulární biologie jsou rychlé, kultivačně nezávislé a citlivé. Jsou založeny na detekci specifického úseku DNA nebo RNA mikroorganismu. [47]

2.5.6.1 PCR

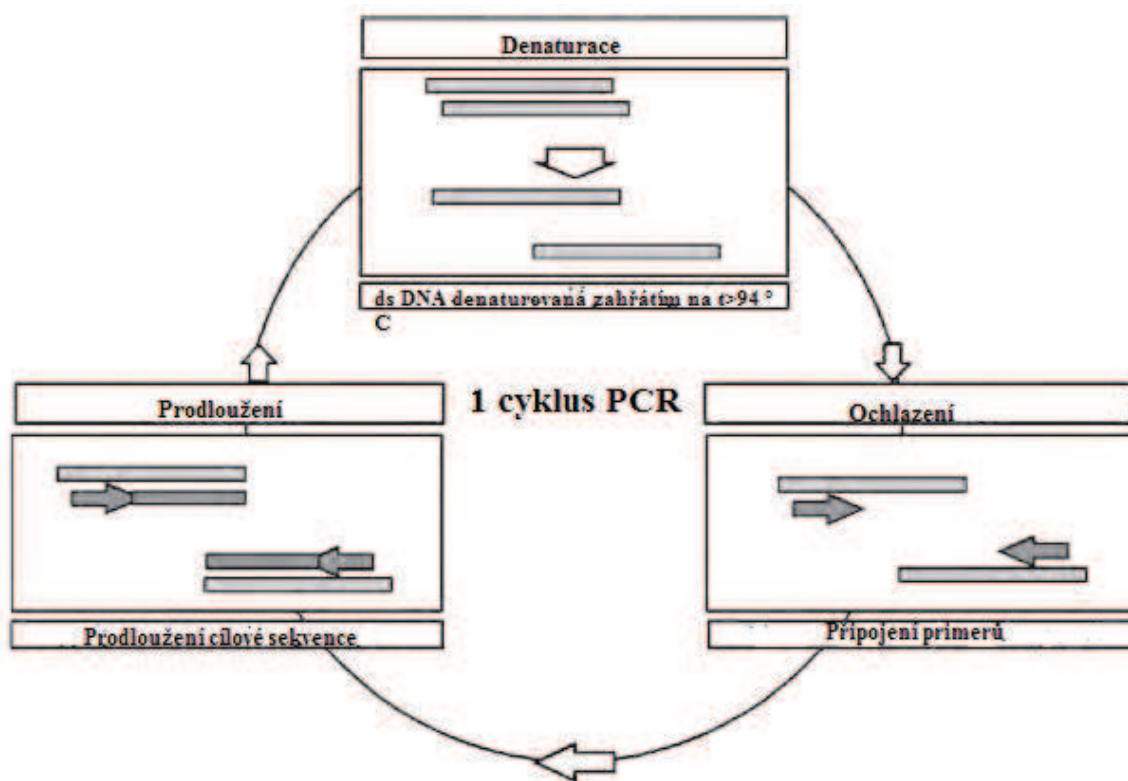
Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je enzymová metoda, která slouží k syntéze definovaného úseku DNA *in vitro*.

DNA je nejprve denaturována, aby došlo k oddělení dvou řetězců. Následně jsou přidány dva primery. Primery jsou komplementární ke koncovým sekvencím fragmentu, který má být amplifikován. Při ochlazení na vhodnou teplotu tyto primery nasednou na komplementární úseky templátu. Primery musí navrženy tak, aby hybridizovaly při stejné teplotě jen s komplementární sekvencí v templátové DNA, a měly shodnout teplotu tání.

Poté je přidána termostabilní polymeráza a směs deoxynukleotidů (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Nejčastěji se používá *Taq* polymeráza (izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*), která odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje, a která má schopnost syntetizovat úseky až 10 kbp. Deoxynukleotidy slouží jako základní kameny pro syntézu nových řetězců DNA podle templátu.

Cyklus se skládá z 3 kroků (obr. 17):

- Denaturace dvouřetězových molekul DNA (94°C, 10s – 1 min)
- Připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30 – 65 °C)
- Syntéza nových řetězců DNA (65-75 °C, 20 s – 2min) [48, 49]



Obrázek 17: Schématické znázornění jednoho cyklu PCR [49]

Celý cyklus se n -krát opakuje. Z n cyklů je nasyntetizováno 2^n kopií DNA. Obvyčně se cyklus opakuje 30 – 35 krát a reakce trvá asi 3 hodiny. [48,49]

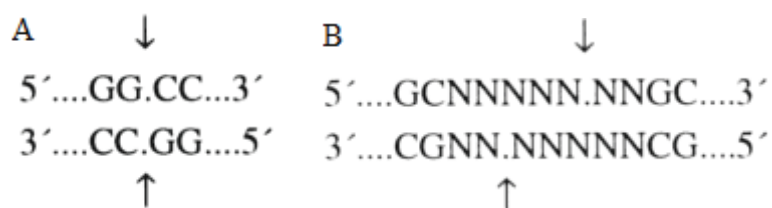
Reakce probíhá v termocycleru, kde se teplota automaticky mění v naprogramovaných časových intervalech. Produktem PCR je amplikon, jehož velikost se stanovuje elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. [47, 48, 50]

2.5.6.2 PCR - RFLP

Stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů u produktů PCR je modifikace standartní PCR, která se používá pro typizaci cílové sekvence určitého genu, který obsahuje sekvenční polymorfismus. Metoda umožňuje rychle a spolehlivě charakterizovat jednotlivé kvasinky a zařadit je tak do příslušných druhů a kmenů. V roce 1998 byla tato metoda použita k rychlé identifikaci vinných kvasinek, později byla metoda využita mnoha autory k identifikaci různých druhů kvasinek, vyskytujících se v nápojích a potravinách. [48, 51]

Oblast mezi geny 18S rRNA a 28S rRNA může být amplifikována pomocí specifických primerů ITS1 a ITS4. Tato oblast obsahuje konzervativní oblast 5,8S rRNA a variabilní oblast, která je využitelná pro kmenové a druhové rozlišení. Obě oblasti se nachází na stejném fragmentu. Po amplifikaci dostaneme amplifikovanou oblast 5,8S-ITS rDNA, která je následně podrobena restriční analýze, kdy jsou amplifikované produkty štěpeny restričními endonukleázami a následně elektroforeticky detekovány.

Restriční endonukleázy jsou enzymy bakteriálního původu, schopné štěpit dvouřetězcové molekuly DNA. Ke štěpení dochází ve specifickém místě, které se nazývá restriční místo a nachází se v rozpoznávacím místě nebo těsně vedle něj (obr. 18). Produktem štěpení jsou úseky DNA o definované délce – restriční fragmenty. [48, 49, 51]



Obrázek 18: Příklad restrikčních míst restrikčních endonukleáz: A) *HaeIII* B) *MwoI* [52]

V současné době je charakterizováno několik typů restrikčních enzymů, z nichž nejvýznamnější jsou endonukleázy II. typu. Názvy restrikčních endonukleáz jsou odvozeny z počátečního písmene rodového a prvních dvou písmen druhového jména organismu, z něhož byly izolovány. Pokud kmen produkuje více restrikčních endonukleáz, odlišují se římskými číslicemi, např. enzym *Haemophilus aegypticus* produkuje enzym *HaeIII*. [48,49]

2.5.6.3 Gelová elektroforéza

K purifikaci, separaci a identifikaci fragmentů DNA získaných pomocí PCR se používá gelová elektroforéza na agarózovém či polyakrylamidovém gelu. Volbou typu a koncentrace gelu lze zajistit vhodné podmínky pro dělení fragmentů v různých rozmezích molekulových hmotností. [50, 53]

Elektroforéza v agarózovém gelu umožňuje separaci DNA fragmentů o velikostech 100 bp – 25 kb. Agaróza je izolovaná z mořských řas rodu *Gelidium* a *Gracilaria* a její řetězce obsahují molekuly D-galaktózy a 3,6-anhydro-L-galaktózy. Během gelování se polymery agarózy nekovalentně pojí a tvoří síť svazků, kde velikost pórů udává propustnost gelu pro molekuly. Polyakrylamidové gely se používají pro separaci molekul o velikosti 10 – 1000 bp. Podle polohy gelu v aparatuře se rozlišuje horizontální a vertikální gelová elektroforéza. [48,54]

Vzorky jsou aplikovány do jamek v gelu a děleny při vhodném napětí, po dobu nezbytnou pro optimální separaci. Fosfátové skupiny molekuly DNA jsou záporně nabitě, proto v přítomnosti elektrického pole, dochází k migraci směrem od katody (-) k anodě (+). Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli v závislosti na jejich velikosti. Rychlost pohybu molekuly v gelu – elektroforetická pohyblivost, je nepřímo úměrná logaritmu její velikosti. Určení velikosti jednotlivých fragmentů se provádí srovnáním elektroforetických pohyblivostí s molekulami nebo fragmenty DNA o známé velikosti tzv. hmotnostními standardy. [48, 54]

Pro identifikaci polohy separovaných molekul je nutné molekuly obarvit vhodným barvivem. Nejčastěji se používá interkalační barvivo ethidium bromid. Ethidium bromid s molekulou DNA tvoří komplex, který po osvětlení UV světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA jsou na gelu viditelné jako proužky, jejichž intenzita je odpovídá koncentraci DNA. [48]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Suroviny

- Bobule révy vinné, které v průběhu září 2013 dodalo vinařství Maňák Žádovice. Celkem bylo dodáno 5 vzorků, které se lišily odrůdou a místem sběru.
- Mošt z bobulí révy vinné odrůdy Ryzlink vlašský, který v průběhu ledna 2014 dodalo vinařství Maňák. Žádovice
- Mošt z bobulí révy vinné, který v průběhu ledna 2014 dodala společnost OenoGala s.r.o. Kobyly. Oba mošty byly pasterizovány a dodány v litrových lahvích.

3.2 Mikroorganismy

- Kvasinka 1 – aktivní suchá vinná kvasinka, Zymaflore VL3, Laffort Francie, izolovaná v Bordeaux.
- Kvasinka 2 – kvasinka byla v předchozích letech vyizolována ze vzorků hroznů, které poskytla společnost OenoGala s.r.o. Kobyly. Vzorky pocházely z lokality Hrabinky, Střelnice a vinice byla bez předchozí chemické ochrany.
- Kvasinka 3 – kvasinka byla v předchozích letech vyizolována z moštů, které poskytlo vinařství Holánek Ivaň.
- Kvasinka 4 – kvasinka byla vyizolována ze vzorků hroznů, které poskytlo vinařství Maňák Žádovice v září 2013. Vzorky pocházely z lokality Žádovice, poslední postřik vinice byl proveden v červenci 2013.
- Kvasinka 5 – kvasinka byla vyizolována ze vzorků hroznů, které poskytlo vinařství Maňák Žádovice v září 2013. Vzorky pocházely z lokality Žádovice, poslední postřik vinice byl proveden v srpnu 2013.

3.3 Chemikálie

- 10× Taq pufr pro PCR mix (*Kapa Biosystems, USA*)
- Agar, kvasniční extrakt (*HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie*)
- Agaróza pro elektroforézu DNA (*Serva Biotech, Německo*)
- Délkový standard 100 bp (*Elizabeth Pharmacon s. r. o., ČR*)
- Délkový standard 20 bp (*Takara Bio, Inc., Japonsko*)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (*Lach-Ner, ČR*)
- dNTP mix (*Kapa Biosystems, USA*)
- Ethanol bezvodý pro UV spektrometrii (*Mach chemikálie s. r. o., ČR*)
- Ethidium bromid (*Serva Biotech, Německo*)
- Galaktóza (*Lachema, ČR*)
- Glukóza (*Lach-Ner s. r. o., ČR*)
- Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát (*Fluka, Španělsko*)
- Hydrogenuhličitan sodný (*Lachema, ČR*)
- Hydroxid sodný (*Lach-Ner s.r.o., ČR*)
- Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (*Elizabeth Pharmacon*)
- Kyselina etylendiamintetraoctová (*Lachema, ČR*)
- Kyselina chlorovodíková (*Lach-Ner s.r.o., ČR*)
- Kyselina sírová (*Lach-Ner s.r.o., ČR*)

- Kyselina trihydrogenboritá (*Serva Biotech, Německo*)
- Laktóza (*Lachema, ČR*)
- Maltóza (*Lachema, ČR*)
- Methylenová modř (*Lach-Ner s.r.o., ČR*)
- Molybdenan amonný (*Lachema, ČR*)
- Nanášecí pufr Loading buffer (*Fermentas, Litva*)
- Octan sodný (*Lachema, ČR*)
- Parafinový olej
- Primery ITS1, ITS4 (*Kapa Biosystems, USA*)
- Quant-iT™ ds DNA HS Assay Kit 0,2 – 100 ng
- Restrikční endonukleasy – *HaeIII, HinfI, HhaI, MseI* (*BioLabs, TaKaRa*)
- Sacharóza (*Lach-Ner s. r. o., ČR*)
- Síran amonný (*Lachema, ČR*)
- Síran hořečnatý heptahydrát (*Lachema, ČR*)
- Síran měďnatý pentahydrát (*Lachema, ČR*)
- Síran sodný (*Lach-Ner s.r.o., ČR*)
- Sladina (*pivovar Starobrno s.r.o., ČR*)
- Sterilní a deionizovaná voda
- Streptomycin sulfát (*Himedia, Indie*)
- Taq DNA polymeráza (*Kapa Biosystems, USA*)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (*Serva Biotech, Německo*)
- Uhličitan sodný (*Lach-Ner s.r.o., ČR*)
- Vinan sodno-draselný (*Lach-Ner s.r.o., ČR*)
- Kyselina propionová (*Reachim, Rusko*)

3.3.1 Živiny přidávané do moštů

Živiny byly poskytnuty spolupracujícími vinaři a byly přidávány do médií ve vybraných testech.

- Actiferm (*Martin Vialatte Enologie, Francie*)

Složení: fosforečnan amonný, síran amonný, thiamin, inaktivované kvasinky, podpůrné látky

- Preferm (*Martin Vialatte Enologie, Francie*)

Složení: Steroly, polynenasycené mastné kyseliny, vitaminy

- Thiazote (*Laffort, Francie*)

Složení: síran amonný, thiamin

3.4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (*A&D, Instruments LTD, Japonsko*)
- Bakteriologické kličky
- Binokulární mikroskop SM5 (*MANEKO, ČR*)
- Buničitá vata
- Bunsenův kahan
- Bürkerova komůrka
- Centrifuga Eppendorf 5430 R (*Eppendorf AG, Německo*)
- Denzitometr DEN 1B (*BIOSAN, ČR*)
- Elektroforetická vana Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (*Biotech s.r.o., ČR*)

- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- Laboratorní třepačka (*UNIMAX, Heidolph, Německo*)
- Lednice a mrazák k uchování vzorků DNA
- Mikropipety Biohit (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Mikropipety pipet4u (*AHN Biotechnologie GmbH, Německo*)
- Mikrovlnná trouba ETA 1195 (*ČR*)
- Mikrozkuhavky Eppendorf
- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (*Biotech s.r.o., ČR*)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (*Implen GmbH, Mnichov, Německo*)
- Parafilm (*American Nacional Cant™, USA*)
- PCR box AURA MINI (*Bioair instruments, Itálie*)
- Plastové Petriho misky
- Předvážky EK-600 H (*A&D, Instruments LTD, Japonsko*)
- Spektrofotometr UV/VIS, Helios (*UNICAM, Anglie*)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci
- Sušárna (*Binder, Německo*)
- Termocyklér PTC-100™, (*MJ Research, Inc, USA*)
- Termostat IP 100-U (*LTE SCIENTIFIC, Velká Británie*)
- Transluminátor (*Ultra Lum. Inc, USA*)
- Vortex LABNET VX 100 (*Biotech s.r.o., ČR*)
- Vortex-Genie 2, MO Bio (*Biotech s.r.o., ČR*)

3.5 Příprava kultivačních médií

3.5.1 Sladinový agar

Do odměrného válce o objemu 500 ml bylo nalito 200 ml sladiny. Roztok byl zředěn vodou na cukernatost 7 °ČSN, uhlíčenem sodným bylo upraveno pH na 6,8. Roztok byl převeden do Erlenmayerových baněk a byl přidán agar. Směs byla promíchána varem a 20 minut sterilizována. Bylo přidáno antibiotikum (80 mg/ml) a kyselina propionová (0,25 ml/l). Kultivační médium bylo nalito do Petriho misek a jako šikmé agary do zkumavek a použito pro kultivaci a úchovu kvasinek.

3.5.2 Sladinové médium

Do odměrného válce o objemu 500 ml bylo nalito 200 ml sladiny. Roztok byl zředěn vodou na cukernatost 7 °ČSN, uhlíčenem sodným bylo upraveno pH na 6,8. Roztok byl převeden do Erlenmayerových baněk a 20 minut sterilizován. Roztok byl použit pro testování tolerance kvasinek k ethanolu.

3.5.3 Glukózové médium 1

5 g glukózy a 0,5 g kvasničného extraktu bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Vzniklý roztok byl sterilizován a použit pro kultivaci kvasinek.

3.5.4 Glukózové médium 2

4 g glukózy, 0,7 kvasničného extraktu, 0,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g KH_2PO_4 a 0,034 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován a použit pro kultivaci kvasinek.

3.6 Příprava pracovních roztoků

3.6.1 Příprava 10×TBE pufru

Pro přípravu zásobního roztoku TBE pufru byl nejprve připraven 0,5 M roztok EDTA. K 9,36 g EDTA bylo přidáno 20 ml destilované vody. Koncentrovaným roztokem NaOH bylo pH upraveno na hodnotu 8. Tato směs byla rozmíchávána na elektrické míchačce do úplného rozpuštění EDTA. Vzniklý roztok byl převeden do odměrné baňky o objemu 50 ml a byl doplněn po rysku destilovanou vodou. Z roztoku 0,5 M EDTA bylo odebráno 40 ml a nalito to 1000 ml odměrné baňky. K roztoku bylo přidáno 108 g Tris a 55 g H₃BO₃. Vše bylo rozpuštěno a doplněno destilovanou vodou po rysku.

3.6.2 Příprava 1×TBE pufru

Z připraveného zásobního roztoku TBE pufru bylo do 1000 ml odměrné baňky odměřeno 100 ml a doplněno po rysku destilovanou vodou. 1×TBE pufr byl následně použitý k přípravě gelů a jako vodivostní pufr pro elektroforézu, do kterého byl přidán ethidium bromid v množství 100 μl na 1000 ml pufru.

3.6.3 Příprava EtBr

Roztok ethidium bromidu byl připraven rozpuštěním 1 g EtBr v 1 ml destilované vody. Roztok byl použitý pro vizualizaci fragmentů DNA na gelu.

3.6.4 Příprava délkového standardu 20 bp

Délkový standard 20 bp byl připraven smícháním 2,5 μl roztoku 20bp, 2,5 μl sterilní destilované vody a 1 μl nanášecího pufru. Délkový standard byl aplikován na gel v množství 6 μl.

3.6.5 Příprava PCR směsi

PCR směs se byla připravena z:

- sterilní voda – 127,2 μl
- pufr – 15 μl
- dNTP mix – 3 μl
- primer ITS 1 – 0,6 μl
- primer ITS 4 – 0,6 μl

K celkovému množství 146,4 μl směsi byly přidány 3 μl DNA a 0,6 μl *Taq* polymerázy. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem, místo DNA byly do směsi přidány 3 μl sterilní vody.

3.6.6 Příprava 2% agarózového gelu

V Erlenmayerově baňce byly smíchány 3 g agarózy s 150 ml 1×TBE pufru. Směs byla rozpuštěna opakovaným zahříváním v mikrovlnné troubě. K rozpuštěné směsi bylo přidáno 15 μl EtBr a připravený roztok byl nalit do elektroforetické vany.

3.6.7 Příprava 3 M octanového pufru

3 M roztok CH₃COONa byl připraven rozpuštěním 2,46 g CH₃COONa v destilované vodě. Pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na hodnotu 5,5. Roztok byl kvantitativně

převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Připravený roztok byl uchován při 4 °C a používán pro přečištění PCR produktů.

3.6.8 Příprava 80% ethanolu

1,6 ml 96% ethanolu bylo smícháno s 0,32 ml destilované vody. Roztok byl skladován v mikrozkuhavce při -20 °C a byl používán k přečištění PCR produktů.

3.6.9 Somogyi-Nelsonovo činidlo I

Ve 100 ml horké vody bylo rozpuštěno 36 g bezvodého Na₂SO₄. Dále bylo přidáno 6 g bezvodého Na₂CO₃, 4 g NaHCO₃ a 3 g vinanu sodno-draselného. Po rozpuštění byl roztok převeden do 200 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Roztok byl použitý pro stanovení redukujících sacharidů.

3.6.10 Somogyi-Nelsonovo činidlo II

24 g bezvodého Na₂SO₄ bylo rozpuštěno ve 100 ml horké vody. Byly přidány 4 g CuSO₄·5H₂O, vzniklý roztok byl kvantitativně převeden do 200 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou po rysku. Roztok byl použitý pro stanovení redukujících sacharidů.

3.6.11 Somogyi-Nelsonovo činidlo III

10 g molybdenanu amonného bylo rozpuštěno ve 180 ml destilované vody. K roztoku bylo přidáno 8 ml koncentrované H₂SO₄. Dále byl připraven roztok ze 1,2 g Na₂HAsO₄·7H₂O a 10 ml destilované vody. Oba roztoky byly převedeny do 200 ml odměrné baňky a doplněny destilovanou vodou po rysku. Vzniklé činidlo bylo před použitím 48 hodin uchováváno.

3.7 Pracovní postupy

3.7.1 Zpracování vzorků

Vzorky bobulí byly vloženy do 200 ml sterilního, sladivého kultivačního média a směs byla kultivována 10 dní při pokojové teplotě. Poté bylo za sterilních podmínek 400 µl suspenze napipetováno na Petriho misku se sladivým agarem a rozetřeno hokejkou. Vzorky byly kultivovány 3 – 5 dní při teplotě 26 °C.

3.7.2 Izolace čisté kultury kvasinek

K izolaci čisté kultury kvasinek ze směsné kultury byla provedena modifikovaná Kochova zředovací metoda, která spočívá v ředění buněk ve sterilní vodě, s následným křížovým roztěrem.

Pomocí bakteriologické kličky byla odebrána z Petriho misky dvě očka kultury, která byla důkladně rozsuspendována v 10 ml sterilní vody. Z promíchané suspenze bylo odebráno 50 µl do zkumavky s 10 ml sterilní vody. Po dokonalém promíchání byl odebrán 1 ml suspenze, který byl rozmíchán v 9 ml sterilní vody. Po promíchání bylo ze zkumavky odebráno 50 µl na Petriho misku a byl proveden křížový roztěr.

Tento postup byl proveden 5 – 6 krát, než byla získána čistá kultura kvasinek. Získané kultury byly kontrolovány mikroskopicky.

Čisté kultury byly přeočkovány na šikmý agar a zality parafinovým olejem a uchovány v chladicím boxu při teplotě 7 °C.

3.7.3 Izolace DNA

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

Do rozbíjecí zkumavky bylo napipetováno 300 µl rozbíjecího pufru, ve kterém byla rozsuspendována dvě očka čisté kvasinkové kultury. K této směsi bylo přidáno 50 µl roztoku MD1 a vše bylo jemně zvortexováno. Mikrozukavky byly vloženy v horizontální poloze do adaptéru vortexu a při maximální rychlosti byly 10 minut vortexovány. Následně byly zkumavky centrifugovány 1 minutu při 10000×g. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozukavky, a bylo přidáno 100 µl MD2. Po opětovné centrifugaci (1 minutu při 10000×g) byl supernatant přenesen do čisté mikrozukavky, a bylo přidáno 900 µl roztoku MD3. Směs byla zvortexována a 700 µl takto vzniklého roztoku bylo přeneseno na kolonku a opět centrifugováno (1 minutu při 10000×g). Přefiltrovaný roztok byl odstraněn, na tutéž kolonku byl přenesen zbytek předchozího roztoku a kolonka s roztokem byla opět centrifugována (1 minutu při 10000×g). Přefiltrovaný roztok byl odstraněn, do kolonky bylo přidáno 300 µl roztoku MD4 a centrifugováno 1 minutu při 10000×g. Kolonka byla opatrně přenesena do čisté mikrozukavky, do středu bílé membrány uvnitř kolonky bylo napipetováno 50 µl roztoku MD5 a následně centrifugováno (1 minutu při 10000×g). Kolonka byla odstraněna a roztok DNA v mikrozukavce byl připraven pro další aplikace. Roztok byl uchován při teplotě -20 °C.

Pro zjištění účinnosti izolace byla pomocí spektrofotometru u náhodně vybraných vzorků změřena koncentrace DNA.

3.7.4 PCR

K 146,4 µl PCR směsi, jejíž příprava je popsána v kapitole 3.6.5 byly přidány 3 µl DNA a 0,6 µl *Taq* polymerázy. Směs byla zvortexována a vložena do termocykléru, kde proběhla polymerázová řetězová reakce podle nastaveného programu, jehož parametry jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Profil programu K1 pro PCR

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

3.7.5 Elektroforetická detekce PCR produktů

PCR produkty byly detekovány pomocí elektroforézy na 2% agaóзовém gelu. Podle počtu vzorků elektroforéza probíhala v malé, střední nebo velké vaně. Množství gelu, hodnota napětí a doba elektroforézy je uvedena v tabulce 5.

Tabulka 5: Parametry elektroforézy

vana	objem gelu (ml)	napětí (V)	čas (hod)
malá	30	45	2 – 3
střední	40	55	2 – 3
velká	60	65	2 – 3

Ztuhlý gel byl nejprve přelit roztokem pufru 1×TBE s ethidium bromidem, jehož příprava je popsána v kapitole 3.6.3. Pufir byl použit v takovém objemu, aby byly zality všechny komůrky v gelu a jeho hladina dosahovala několik milimetrů nad povrch gelu. 5 µl vzorku bylo nejprve smícháno s 1 µl nanášecího pufru, 5 µl této směsi bylo napipetováno do jamky v gelu. Negativní kontrola byla připravena stejným způsobem a na gel bylo naneseno také 5 µl. Na okraje gelu byl nanesen délkový standard o velikosti 100 bp v množství 3 µl. Teno délkový standard byl dodán již v připravené formě.

Fragmenty DNA s navázaným ethidium bromidem byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru a gel byl zdokumentován pomocí programu Scion Image.

3.7.6 Přečištění PCR produktů

Nejprve bylo 20 µl amplifikované DNA smícháno s 2 µl octanového pufru. Tato směs byla zvortexována a bylo přidáno 60 µl 96% ethanolu vychlazeného na teplotu – 20 °C. Následovala centrifugace po dobu 30 minut při 4 °C a 15 000 otáčkách. Supernatant byl dekantován a do mikrozkuhavky bylo přidáno 60 µl 80% ethanolu. Směs byla zvortexována centrifugována po dobu 30 minut při 4 °C a 15 000 otáčkách. Supernatant byl dekantován a mikrozkuhavky byly zbaveny zbytku ethanolu vysušením v exsikátoru.

3.7.7 Restrikční analýza

Do mikrozkuhavky bylo k přečištěné DNA napipetováno 13,4 µl sterilní vody, 1,5 µl pufru a 0,1 µl enzymu. Vzorky byly vloženy do termocykléru a inkubovány 16 hodin při teplotě 37 °C a 20 minut při inaktivační teplotě enzymu. Seznam použitých enzymů a parametry inkubace jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Použité restrikční enzymy [55]

Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo	Teplota inkubace (°C)	Teplota inaktivace (°C)
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	GG↓CC CC↑GG	37	80
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCG↓C C↑GCG	37	80
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenza</i>	G↓ATC CTA↑G	37	80
<i>MseI</i>	<i>E.coli</i> + gen z <i>Micrococcus sp.</i>	T↓TAA AAT↑T	37	65

3.7.8 Elektroforetická detekce restrikčních fragmentů

Elektroforetická detekce restrikčních fragmentů proběhla stejným způsobem, jako detekce PCR produktů popsána v kapitole 3.7.5.

Místo negativní kontroly byla na gel nanesena pozitivní kontrola, kterou byl PCR produkt. Kromě délkového standardu o velikosti 100 bp, byl použit i délkový standard o velikosti 20 bp.

3.7.9 Zkvašování sacharidů

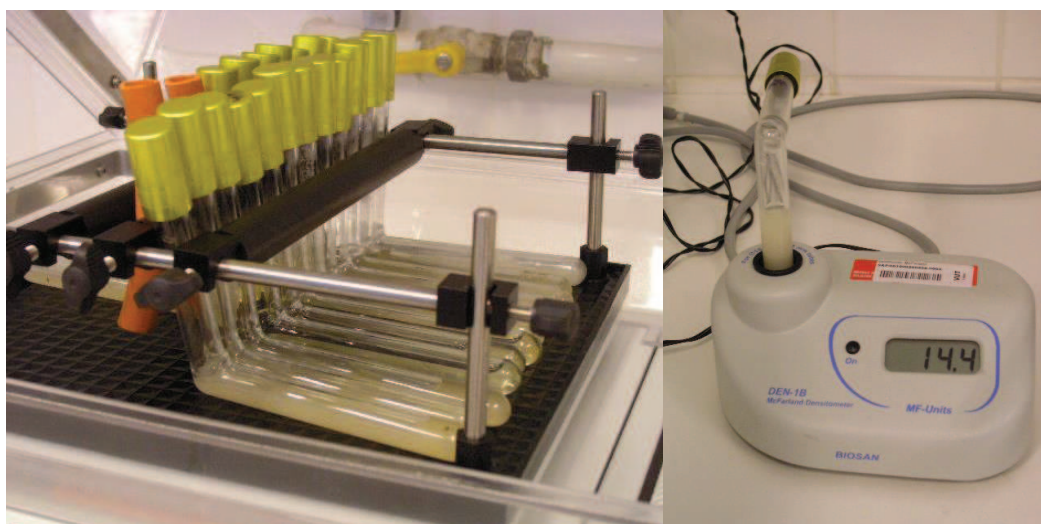
Zkumavky s Durhamovými plynovkami (otočenými dnem vzhůru) byly naplněny 10 ml média, které obsahovalo 2 % testovaného sacharidu a 0,3 % kvasničného extraktu. Zkumavky byly plněny tak, aby v plynovkách nezůstala žádná vzduchová bublina. Po sterilizaci bylo médium zaočkováno 0,5 ml suspenze dvoudenní kultury kvasinek a inkubováno 2 dny při teplotě 26 °C.

Testovány byly tyto sacharidy: glukóza, galaktóza, maltóza, sacharóza a laktóza.

3.7.10 Sledování růstu kvasinek

10 ml sterilního média v L zkumavce bylo zaočkováno 0,5 ml suspenze dvoudenní kultury kvasinek. Kultivace proběhla na třepačce (obr. 18) při 115 rpm a teplotě 25 °C.

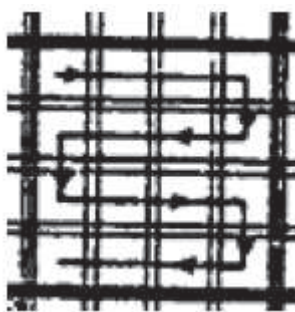
Ve stanovených časových intervalech byla pomocí denzitometru (viz obr. 18) změřena optická hustota a byl stanoven počet živých a mrtvých buněk.



Obrázek 18: Kultivace na třepačce a měření optické hustoty pomocí denzitometru

Počítání buněk

Pomocí Pasteurovy pipety bylo malé množství vzorku naneseno na Bürkerovu komůrku, bylo přidáno malé množství metylenové modři, komůrka byla přikryta krycí skličkem a po pěti minutách byly pod mikroskopem spočítány mrtvé a živé buňky. Buňky byly počítány podle schématu na obrázku 19.



Obrázek 19: Schéma počítání buněk v Bürkerově komůrce [56]

Pro počítání byla dodržována tato pravidla:

- Buňky, které se dotýkají nebo leží na hraničních čarách polí, se počítají, pokud se jedná o horní nebo pravou stranu.
- Pučící buňka se počítá jako jedna buňka.
- Pokud nese neoddělené dceřiná buňka další pupenec, počítají se jako dvě buňky [56]

3.7.11 Sledování osmotolerance kvasinek

Pro stanovení osmotolerance, tedy tolerance kvasinek vůči vyšším koncentracím sacharidů byla připravena dvě média. První médium bylo složeno z 0,4 % sušeného kvasničného extraktu, 10 % glukózy a 5 % NaCl, druhé médium bylo složeno z 0,4 % sušeného kvasničného extraktu a 50 % glukózy.

10 ml sterilního média v L zkumavce bylo zaočkováno 0,5 ml suspenze dvoudenní kultury kvasinek a inkubováno na třepačce při 115 rpm a teplotě 25 °C. Ve stanovených časových intervalech byla denzitometrem měřena optická hustota, jakožto parametr růstu buněk.

3.7.12 Sledování tolerance kvasinek k alkoholu

Pro zjištění tolerance kvasinek vůči alkoholu bylo použito sladidové médium. K 10 ml sterilního média v L zkumavce bylo přidáno 1, 4, 8, 12, 16 a 18 % ethanolu. Poté bylo médium zaočkováno 0,5 ml suspenze dvoudenní kultury kvasinek a inkubováno na třepačce při 115 rpm a teplotě 25 °C. Ve stanovených časových byla denzitometrem měřena optická hustota, která je jedním z ukazatelů růstu buněk.

3.7.13 Sledování průběhu fermentace

200 ml sterilní média v Erlenmayerově baňce bylo zaočkováno 0,5 ml suspenze dvoudenní kultury kvasinky. Erlenmayerovy baňky byly zváženy a uchovávány při teplotě 18 °C.

3.7.13.1 Stanovení množství uvolněného CO₂

Ve stanovených časových intervalech byla sledována změna hmotnosti, způsobená úbytkem CO₂. Ve stejných časových intervalech byl z každé Erlenmayerovy baňky odebrán 1,5 ml média, pro následné stanovení redukujících sacharidů.

3.7.13.2 Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho-Nelsona

Do vhodně zředěného vzorku (viz příloha 13) o objemu 1 ml bylo přidáno 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla I a II. Směs byla 10 minut povařena ve vodní lázni a následně ochlazená. Bylo přidáno 0,5 ml Somogyiho-Nelsonova činidla III. Směs byla intenzivně

promíchána, aby došlo k rozpuštění vyloučeného oxidu měďnatého a poté doplněna destilovanou vodou na celkový objem 10 ml. Byla změřena absorbance při vlnové délce 720 nm.

Pro stanovení kalibrační křivky byly připraveny vodné roztoky glukózy o koncentracích 0,000; 0,005; 0,010; 0,015; 0,020; 0,025; 0,030; 0,035; 0,040; 0,045; 0,050 g·l⁻¹. Pro stanovení jejich absorbance bylo postupováno stejným způsobem jako u ostatní vzorků.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Izolace čistých kultur kvasinek

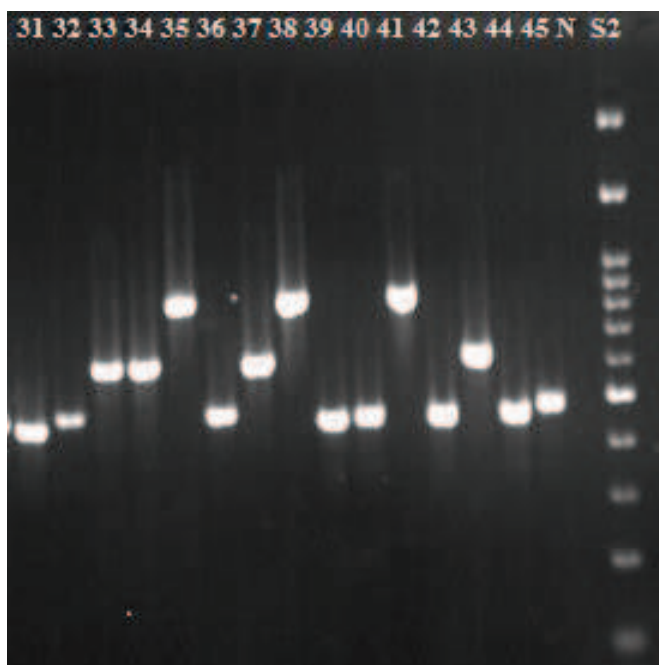
Z pěti vzorků bobulí, odebraných na různých tratích, byly kultivací v tekutém médiu a na Petriho miskách získány směsné kultury. Z těchto směsných kultur byly pomocí Kockovy zředovací metody získané čisté kultury kvasinek. Aby byla získána opravdu čistá kultura, bylo ředění 6krát opakováno a doplněno kontrolou vzorků pod mikroskopem. Celkem bylo vyizolováno 18 čistých kultur kvasinek, které byly uchovány na šikmém agaru pod parafinovým olejem, označeny čísla a použity k dalšímu zpracování.

Pracovní označení čistých kultur: 3, 5, 6, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45.

Pro srovnání byla mezi vzorky zařazena komerční kultura ASVK označena v1.

4.2 Amplifikace DNA pomocí PCR

Pro identifikaci čistých kultur kvasinek a jejich zařazení do rodů byla použita polymerázová řetězová reakce s následnou restrikční analýzou. Polymerázová řetězová reakce byla provedena s primery ITS1 a ITS4 ohraničujícími oblast 5,8S-ITS rDNA, která byla v průběhu reakce amplifikována. K detekci PCR produktů byla provedena gelová elektroforeza na 2% agarózovém gelu. Velikost PCR produktů byla ze získaného elektroforeogramu určena pomocí programu Bionumerics. Na obrázku 20 je příklad elektroforeogramu vzorků 3,5 a 6, ostatní elektroforeogramy (vzorky 31 – 45, v1) jsou uvedeny v příloze 4.



Obrázek 20: Ukázka elektroforeogramu PCR produktů získaných amplifikací primery ITS1 a ITS4

(N – negativní kontrola, S2 – délkový standard 100 bp, 3,5,6 – PCR produkty)

V tabulce 7 jsou shrnuty velikosti všech PCR produktů. Amplifikací specifického úseku DNA byly získány amplikony o velikosti 480, 500, 650 a 880 bp. U každého vzorku byl pozorován pouze jeden fragment, což potvrzuje skutečnost, že se jednalo o čisté kultury kvasinek. PCR produkty byly podrobeny restriční analýze.

Tabulka 7: Velikost amplikonů jednotlivých vzorků (POV – pracovní označení vzorku, VA – velikost amplikonu)

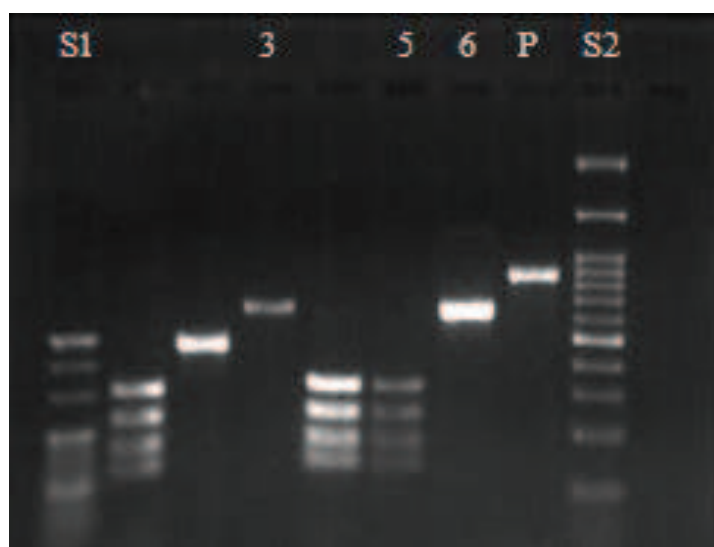
POV	VA (bp)
5	880
35	880
38	880
41	880
v1	880
3	650
6	650
33	650
34	650
37	650
43	650
32	500
36	500
45	500
31	480
39	480
40	480
42	480
44	480

4.3 Restrikční analýza PCR-RFLP

PCR produkty byly před samotnou restrikční analýzou přečištěny (postup viz kap.3.7.6), aby byly odstraněny komponenty PCR směsi, které by mohly inhibovat restrikční endonukleázy. K čisté DNA byly aplikovány restrikční endonukleázy *HaeIII*, *HinfI* a *HhaI*. Identifikace vzorků byla provedena porovnáním délek restrikčních fragmentů typových kvasinek z databáze, která byla v rámci diplomových prací vytvořena v předchozích letech.

4.3.1 Restrikční analýza enzymem *HaeIII*

Restrikční endonukleáza *HaeIII* rozpoznává oblast GGCC a ke štěpení dochází mezi nukleotidy G a C. Vzniklé restrikční fragmenty byly elektroforeticky detekovány. Vybraný příklad elektroforegramu restrikčních fragmentů je zobrazen na obrázku 21, ostatní elektroforegramy jsou uvedeny v příloze 4.



Obrázek 21: Ukázka elektroforegramu restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktů pomocí restrikční endonukleázy *HaeIII*,
(*P* – pozitivní kontrola, *S1* – délkový standard 20 bp, *S2* – délkový standard 100 bp,
3, 5, 6 – štěpené PCR produkty)

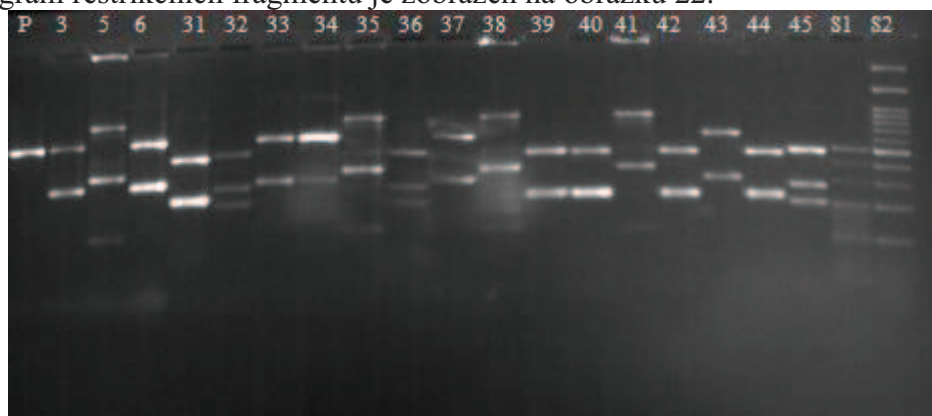
V tabulce 8 jsou shrnuty délky restrikčních fragmentů PCR produktů štěpených enzymem *HaeIII*. Restrikční analýzou PCR produktů o délce 880 bp byly získány 4 fragmenty o délce 310 + 220 + 170 + 130 bp. PCR produkty o délce 650 bp a 480 bp nebyly restrikční endonukleázou *HaeIII* štěpeny. PCR produkty o délce 500 bp byly restrikázou štěpeny na fragmenty o délce 320 + 90 + 50 bp.

Tabulka 8: Velikost restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů restrikční endonukleázou *HaeIII*. (POV – pracovní ozn. vzorku VA – velikost ampliconu, VRF – velikost restrikčního fragmentu)

POV	VA (bp)	VRF (bp)
5	880	310+220+170+130
35	880	310+220+170+130
38	880	310+220+170+130
41	880	310+220+170+130
v1	880	310+220+170+130
3	650	n
6	650	n
33	650	n
34	650	n
37	650	n
43	650	n
32	500	320+90+50
36	500	320+90+50
45	500	320+90+50
31	480	n
39	480	n
40	480	n
42	480	n
44	480	n

4.3.2 Restrikční analýza enzymem *HinfI*

Restrikční endonukleáza *HinfI* rozpoznává oblast GATC a ke štěpení dochází mezi nukleotidy G a A. Vzniklé restrikční fragmenty byly elektroforeticky detekovány. Elektroforegram restrikčních fragmentů je zobrazen na obrázku 22.



Obrázek 22: Ukázka elektroforeogramu restrikčních fragmentů získaných štěpením PCR produktů pomocí restrikční endonukleázy *HinfI*, (P – pozitivní kontrola, S1 – délkový standard 20 bp, S2 – délkový standard 100 bp, 3 – 45 – štěpené PCR produkty)

Tabulka 9 obsahuje délky jednotlivých fragmentů získané štěpením PCR produktů enzymem *HinfI*. PCR produkty o délce 880 bp byly restriktázou štěpeny na 2 fragmenty o délce 360 + 150 bp. Štěpením ampliconů o délce 650 bp byl získán fragment o velikosti 300 bp. PCR produkty délky 500 bp byly enzymem štěpeny na 2 fragmenty délky 300 + 200 bp a štěpením vzorků o délce 480 bp byl získán jeden fragment o délce 220 bp.

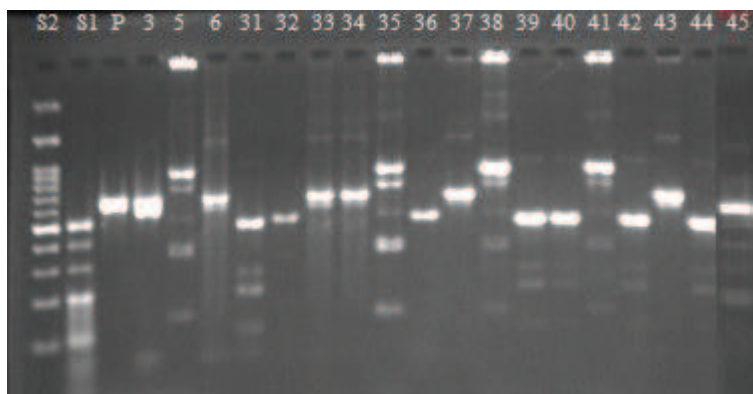
Tabulka 9: Velikost restričních fragmentů získaných štěpením PCR produktů restriční endonukleázou *HinfI*

(POV – pracovní ozn. vzorku, VA – velikost ampliconu, VRF – velikost restričního fragmentu)

POV	VA (bp)	VRF (bp)
5	880	360+150
35	880	360+150
38	880	360+150
41	880	360+150
v1	880	360+150
3	650	300
6	650	300
33	650	300
34	650	300
37	650	300
43	650	300
32	500	300+200
36	500	300+200
45	500	300+200
31	480	220
39	480	220
40	480	220
42	480	220
44	480	220

4.3.3 Restriční analýza enzymem *HhaI*

Restriční endonukleáza *HhaI* rozpoznává oblast GCGC a ke štěpení dochází mezi nukleotidy G a C. Vzniklé restriční fragmenty byly elektroforeticky detekovány. Elektroforegram restričních fragmentů je zobrazen na obrázku 23.



Obrázek 23: Ukázka elektroforeogramu restričních fragmentů získaných štěpením PCR produktů pomocí restriční endonukleázy *HhaI*,
(S2 – délkový standard 100 bp, S1 – délkový standard 20 bp, P – pozitivní kontrola
3 – 45 – štěpené PCR produkty)

Tabulka 10 obsahuje délky jednotlivých fragmentů získané štěpením PCR produktů enzymem *HhaI*. PCR produkty o délce 880 bp byly štěpeny na 3 fragmenty délky 380 + 350 + 140 bp, PCR produkty délky 480 bp byly štěpeny na fragmenty o délce 280 + 220 bp. Amplikony o délce 650 a 500 enzymem *HhaI* nebyly štěpeny.

Tabulka 10: Velikost restričních fragmentů získaných štěpením PCR produktů restriční endonukleázou *HhaI*. (POV – pracovní ozn. vzorku, VA – velikost amplikonu, VRF – velikost restričního fragmentu)

POV	VA (bp)	VRF (bp)
5	880	380+350+140
35	880	380+350+140
38	880	380+350+140
41	880	380+350+140
v1	880	380+350+140
3	650	n
6	650	n
33	650	n
34	650	n
37	650	n
43	650	n
32	500	n
36	500	n
45	500	n
31	480	280+220
39	480	280+220
40	480	280+220
42	480	280+220
44	480	280+220

Taxonomické zařazení vzorků bylo provedeno porovnáním délek restričních fragmentů typových kvasinek z databáze, která byla v rámci diplomových prací vytvořena v předchozích letech a z dalších dostupných databází z odborných článků [57]. Souhrn identifikovaných kvasinek, které byly izolovány ze vzorků hroznů, je uveden v tabulce 11.

Vzorky o délce PCR produktu 880 bp (5, 35, 38, 41, v1) byly identifikovány jako rod *Saccharomyces*. Vzorky o délce PCR produktu 650 bp, 500 bp a 480 bp identifikovány jako rod *Pichia* a tyto vzorky byly identifikovány a zařazeny i na druhové úrovni. Vzorky 3, 6, 33, 34, 37 a 43 o délce PCR produktu 650 bp byly taxonomicky zařazeny jako *Pichia subpelliculosa*. Vzorky 32, 36 a 45 o velikosti PCR produktu 500 bp byly taxonomicky zařazeny jako *Pichia membranifaciens* a vzorky 31, 39, 40, 40 a 44 o velikosti PCR produktu 480 bp byly identifikovány jako *Pichia fluxum*.

Tabulka 11: Taxonomické zařazení vzorků (POV – pracovní ozn. vzorku)

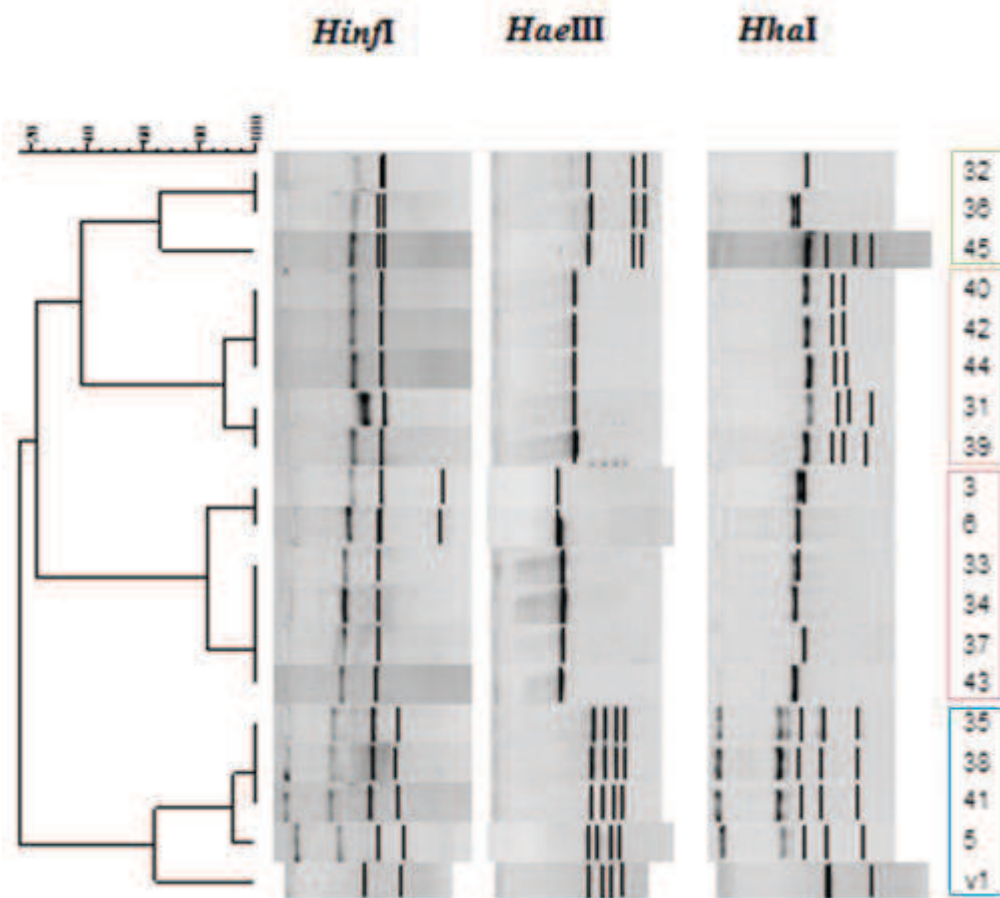
POV	Taxonomické zařazení
5	<i>Saccharomyces sp.</i>
35	
38	
41	
v1	
3	<i>Pichia subpelliculosa</i>
6	
33	
34	
37	
43	
32	<i>Pichia membranifaciens</i>
36	
45	
31	<i>Pichia fluxum</i>
39	
40	
42	
44	

Vybrané vzorky (5 a 41), zařazené do rodu *Saccharomyces*, byly dále testovány za účelem výběru nejvhodnější autochtonní kvasinky pro výrobu vína.

4.3.4 Dendrogram identifikovaných kvasinek

Dendrogram kvasinek byl sestaven pomocí programu BioNumerics. Dendrogram byl vytvořen na základě UPGMA klastrové analýzy. Cílem této analýzy je najít v souboru dat skupiny, které jsou si podobné, ale liší se ostatních skupin. Jedná se o sloučení vzorků do skupin na základě jejich vlastností. Jako kritérium byly zvoleny Jaccardovy koeficienty podobnosti. Vstupními daty byly výsledky restriční analýzy, která byla provedena pomocí

restrikčních endonukleáz *HaeIII*, *HinfI* a *HhaI*. Za účelem srovnání výsledků z různých gelů, byla nastavena 4% tolerance pozice fragmentu na gelu. Výsledkem klastrové analýzy je rozdělení vzorků do 4 skupin. Tyto skupiny jsou v dendrogramu (viz obrázek 24) barevně odlišeny a korespondují s taxonomickým zařazením vzorků po restriktivní analýze.

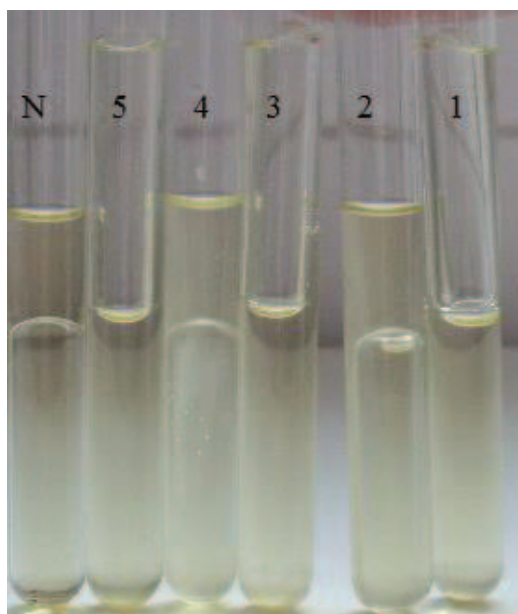


Obrázek 24: Dendrogram vyizolovaných kvasinek, získaný na základě restriktivní analýzy pomocí enzymů *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*.

4.4 Zkvašování sacharidů

Pro potvrzení a doplnění předchozí identifikace kvasinek pomocí RFLP-PCR byl proveden test zkvašování sacharidů. Pro tento test byly vybrány dva vzorky kvasinek izolovaných z bobulí vinařství Maňák (č. 5 a č. 41), dále kvasinky vinařství Gala a Holánek vyizolované v předchozích letech a pro srovnání byla zařazena jedna komerční kvasinka. Tyto kvasinky byly použity i v následujících testech a jsou popsány v kapitole 3.2).

Pro test byla použita glukóza, galaktóza, maltóza, sacharóza a laktóza a vyhodnocení bylo provedeno na základě pravidel uvedených v kapitole 2.5.4. Byla provedena i negativní kontrola, kdy do média nebyl přidán žádný sacharid. Výsledky byly fotograficky zdokumentovány (příklad viz obr. 25).



Obrázek 25: Zkvašování maltózy (N – negativní kontrola)

Maltózu zkvašovaly kvasinky 1, 3 a 5. Na obrázku 25 je vidět, že v těchto případech byly Durhamovy plynovky vytlačeny vznikajícím CO₂. Stejným způsobem byly zhodnoceny všechny testy zkvašování sacharidů a výsledky jsou shrnuty v tabulce 12.

Tabulka 12: Vyhodnocení zkvašování sacharidů testovanými kvasinkami 1 – 5

	glukóza	galaktóza	maltóza	sacharóza	laktóza	kvasný typ
kvasinka 1	+	+	+	+	-	II
kvasinka 2	+	-	-	+	-	III
kvasinky 3	+	+	+	-	-	I
kvasinka 4	+	+	-	-	-	IV
kvasinka 5	+	-	+	+	-	II

Jak je vidět v tabulce 12 všech pět kvasinek zkvašovalo glukózu, tím pádem i fruktózu a manózu a zároveň žádná z kvasinek nezkašovala laktózu. Všech 5 kvasinek lze tedy zařadit do rodu *Saccharomyces*.

Podle schopnosti kvasit sacharózu a maltózu lze kvasinky rodu *Saccharomyces* rozdělit do 4 skupin, z nichž z hlediska vinařské technologie je nejvýznamnější skupina *cerevisiae*, tedy skupina kvasný typ II. Do této patří kvasinky schopné kvasit maltózu i sacharózu, v našem případě kvasinka 1 (komerční) a kvasinka 5 (autochtonní).

➤ Z hlediska zkvašování sacharidů je pro využití v procesu výroby vína vhodná autochtonní kvasinka 5, která kromě glukózy zkvašovala maltózu i sacharózu a byla zařazena do skupiny kvasný typ II.

4.5 Sledování růstu kvasinek

Pro samotnou alkoholovou fermentaci je důležitá příprava inokula, jeho výchozí koncentrace a vitalita. Za účelem zjištění, v jakém prostředí se kvasinky nejrychleji a nejefektivněji namnoží a která kvasinka je pro dané prostředí nejvhodnější, byla provedena kultivace čtyř kvasinek autochtonních a jedné komerční kvasinky v různých prostředích. Testována byla jak reálná prostředí – mošty poskytnuté vinaři (viz kapitola 3.1), tak umělá prostředí – glukózová média.

- Prostředí A – vinný mošt, pasterizovaný, mírně zasařený
- Prostředí K – vinný mošt, pasterizovaný, nezasářený
- Prostředí A+ – vinný mošt s přidavkem živin, pasterizovaný, mírně zasařený
- Prostředí K+ – vinný mošt s přidavkem živin pasterizovaný, nezasářený
- Prostředí G – glukózové médium
- Prostředí G+ – glukózové médium s přidavkem živin
- Prostředí GN – glukózové médium s minerálními látkami

Rychlost růstu kvasinek byla sledována měřením optické hustoty pomocí denzitometru (naměřené hodnoty viz příloha 5). Touto metodou není možné rozlišit živé a mrtvé buňky. Z toho důvodu bylo provedeno počítání živých buněk v Bürkově počítací komůrce. Optická hustota byla měřena 1, 3, 6, 9, 12 h, a poté každých 24 hodin od zaočkování. Počítání živých buněk bylo provedeno denně, ve stejnou dobu.

Počet živých buněk v 1 ml suspenze byl vypočítán ze vztahu: $x = \frac{C \cdot Z \cdot \frac{1}{V} \cdot 1000}{P}$;

kde:

x...počet kvasinek v 1 ml

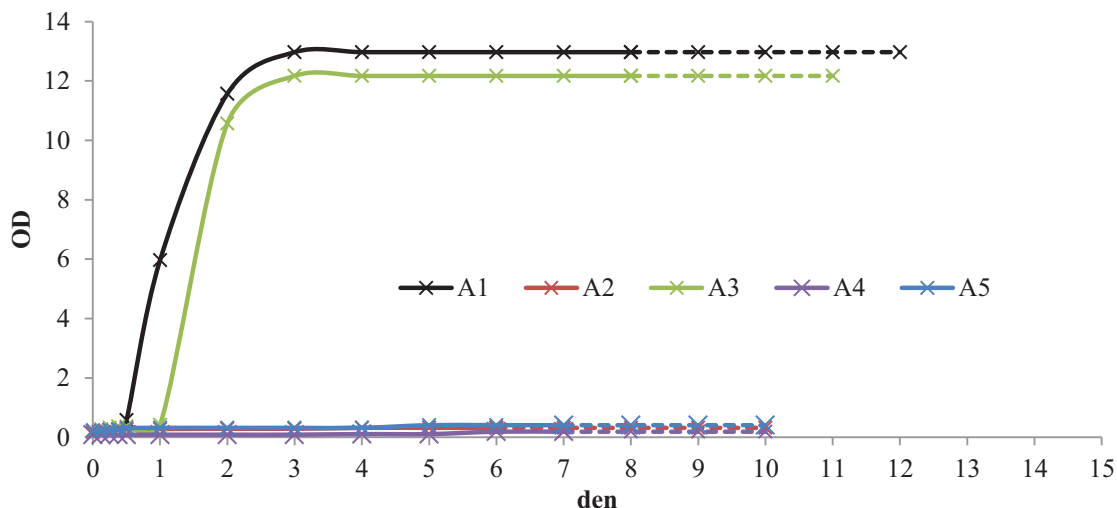
C...celkový počet kvasinek ve všech počítaných políčkách

Z...číslo zředění

P...počet počítaných polí

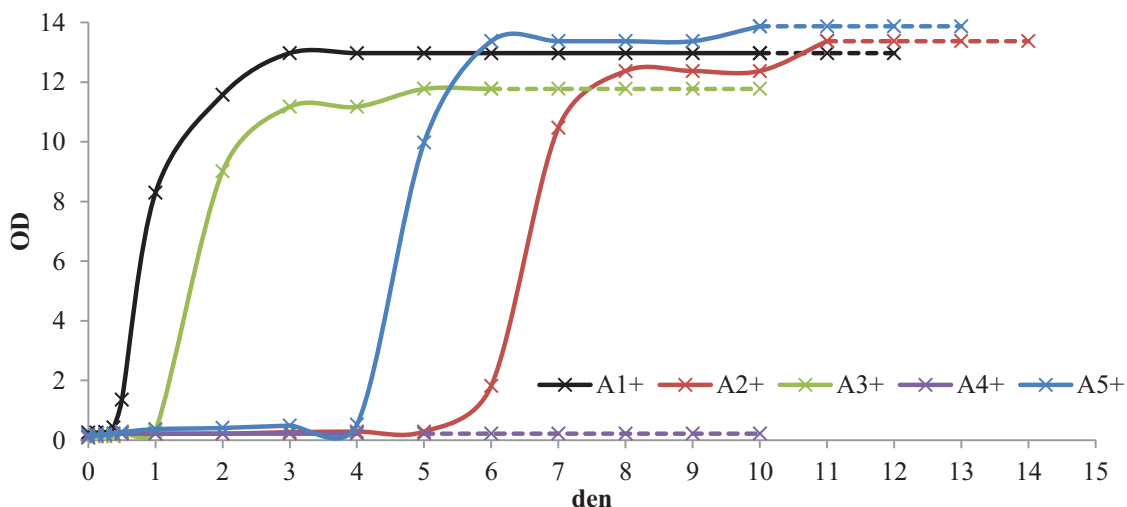
V...objem zvoleného pole

Z hodnoty x byl vypočítán logaritmus živých buněk v 1 ml suspenze (výsledky viz příloha 6). Hodnoty logaritmu živých buněk byly graficky porovnány s naměřenou optickou hustotou (viz příloha 7) a z těchto tzv. růstových křivek byla odečtena časová hranice, do které byly buňky v médiu ještě živé a od které začaly odumírat. Na základě těchto hodnot byly sestrojeny grafy 2 – 8, kde je znázorněna závislost optické hustoty na čase. Jednotlivé úseky, kdy již buňky odumírají, jsou zde znázorněny čárkovaně.



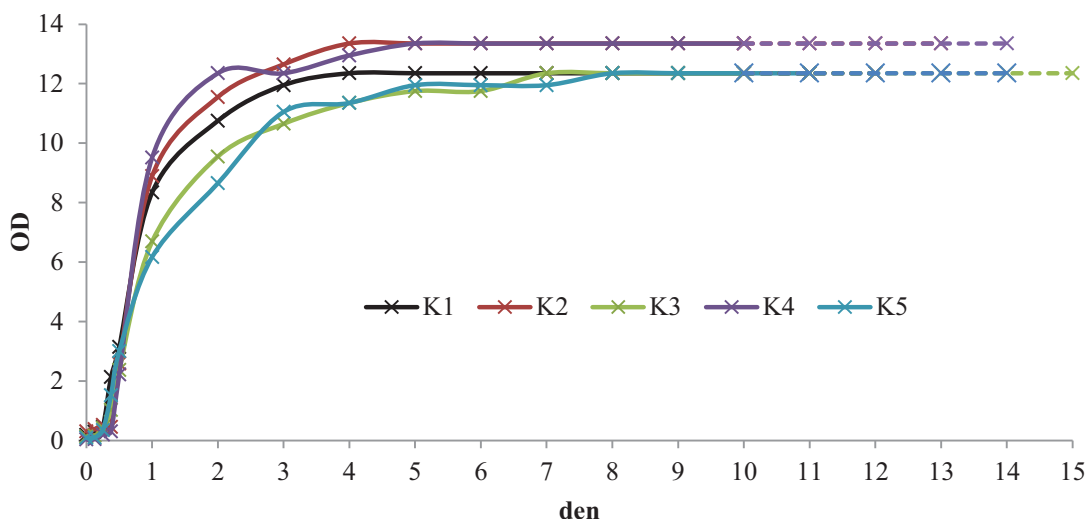
Graf 2: Růstové křivky kvasinek – prostředí A

Testované médium A byl zasařený vinný mošt. Jak můžeme vidět v grafu 2, v prostředí rostly pouze kvasinky 1 a 3, přičemž lag fáze kvasinky 1 trvala kratší dobu, a nárůst kvasinek byl vyšší. Kvasinky začaly odumírat ve stejný den – 8. den po zaočkování. Kvasinky 2, 4 a 5 se v tomto zasařeném prostředí nemnožily vůbec. Přežily zde do 7. dne a poté začaly odumírat. V zasařeném prostředí se v tomto případě jako nejvhodnější autochtonní kvasinka jeví kvasinka 3.



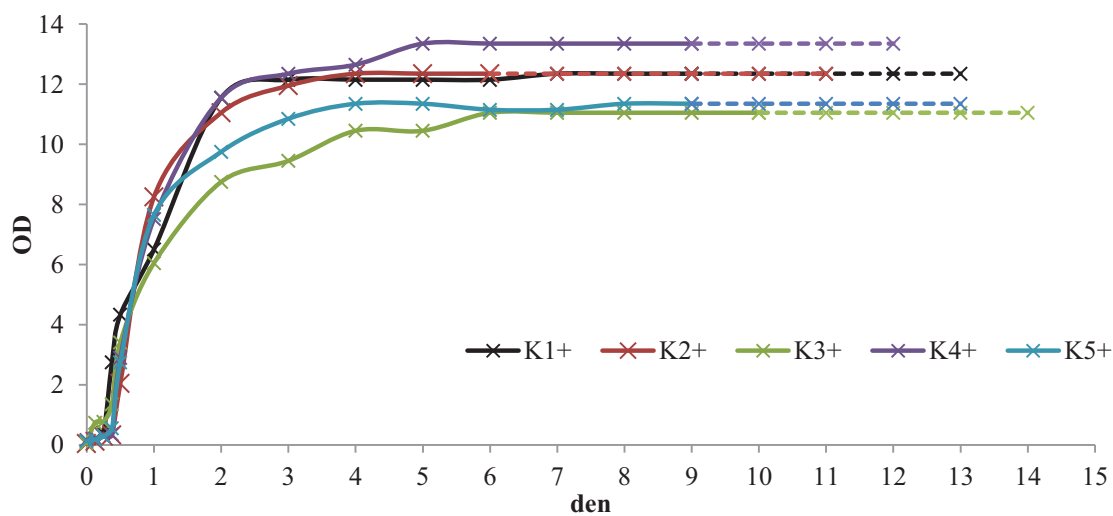
Graf 3: Růstové křivky kvasinek – prostředí A+

V zasařeném prostředí média A+ s přidavkem živin se kvasinky množily lépe, než bez jejich přidání. Z grafu 3 plyne, že kromě kvasinky 4, která se nemnožila a po 5. dni začala odumírat, se množily všechny kvasinky. Nejvyšší množství buněk bylo zaznamenáno u kvasinek 2 a 5, ale vzhledem k dlouhé lag fázi, která trvala 4 a 5 dní je pro tohle prostředí vhodné použít kvasinku 3, která se pomnožila méně, ale lag fáze trvala jeden den a maximální koncentrace kvasinek bylo dosaženo v nejkratším časovém intervalu.



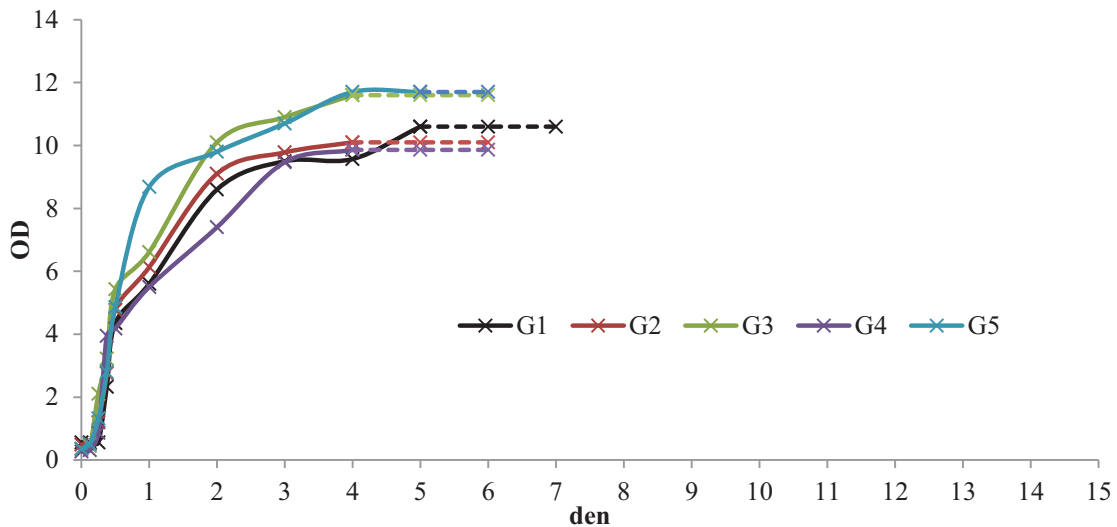
Graf 4: Růstové křivky kvasinek – prostředí K

V prostředí nezasířeného moštu K se množily všechny kvasinky (viz graf 4) Nejrychleji se v prostředí množily kvasinky 2 a 4, které se v zasířeném prostředí vůbec nemnožily. Lag fáze trvala u všech kvasinek krátkou dobu, a to 9 – 12 hodin a proto by prostředí mohlo být použito jako médium pro přípravu inokula. Z hlediska růstu v prostředí moštu K jsou ve srovnání s komerční kvasinkou vhodné všechny 4 autochtonní kvasinky.



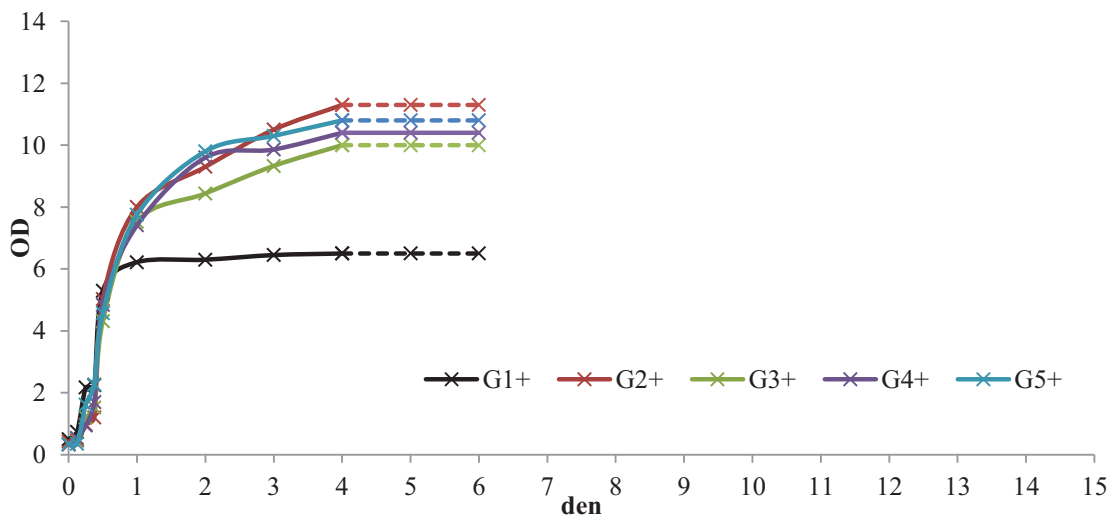
Graf 5: Růstové křivky kvasinek – prostředí K+

Z grafu 5 je patrné, že v nezasířeném vinném moštu s přidavkem živin (K+) se množily všechny kvasinky. V porovnání s případem, kdy byl použit mošt bez přidavku živin, zde trvala lag fáze kratší dobu, a to 6 – 9 hodin. Z toho důvodu by médium mohlo být použito pro přípravu inokula. Vhodnými autochtonními kvasinkami jsou z hlediska prostředí K+ všechny čtyři kvasinky, zejména pak kvasinky 2 a 5.



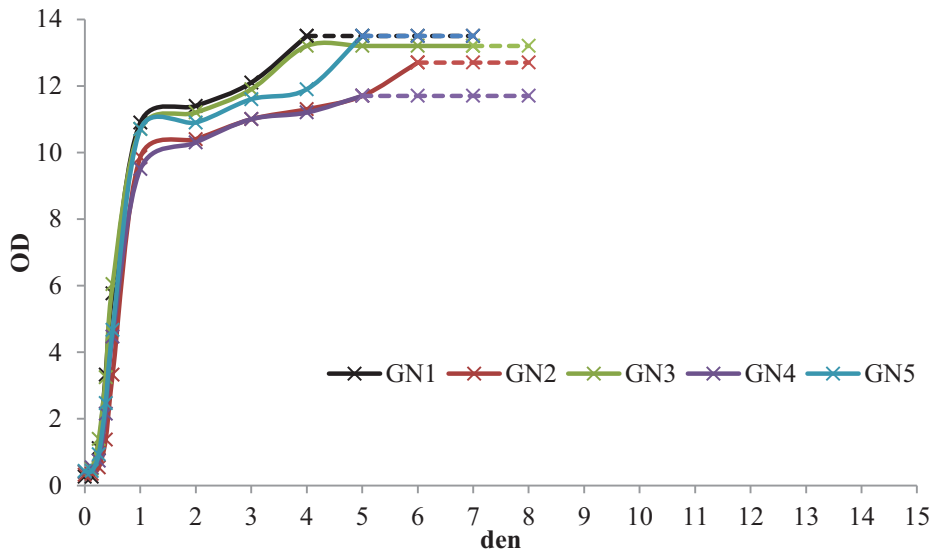
Graf 6: Růstové křivky kvasinek – prostředí G

V případě použití glukózového média, můžeme v grafu 6 vidět, že se všechny kvasinky množily. Lag fáze v tomto případě trvala velmi krátkou dobu, a to 3 – 6 hodin. Kvasinky v tomto prostředí začaly odumírat podstatně dříve, než ve vinných mošttech. Kvasinky 1 a 5 začaly odumírat 5. den po zaočkování a kvasinky 2, 3, 4 již 4. den po zaočkování. Přestože životnost namnožených kvasinek není dlouhá, glukóзовé médium by mohlo být pro přípravu inokula použito, protože se zde kvasinky rozmnožují poměrně rychle. Jako nejvhodnější z autochtonních kvasinek se jeví kvasinky 3 a 5, které se množily nejrychleji.



Graf 7: Růstové křivky kvasinek – prostředí G+

Z grafu 7 plyne, že v glukózovém médiu s přidavkem živin rostly všechny kvasinky. Jejich životnost byla v prostředí krátká, kvasinky odumíraly od 4. dne po zaočkování. Lag fáze trvala kratší dobu než v případě bez přidavku živin – 3 hodiny, tudíž by médium mohlo být použito pro přípravu inokula. Všechny autochtonní kvasinky rostly rychleji než komerční kvasinka.



Graf 8: Růstové křivky kvasinek – prostředí GN

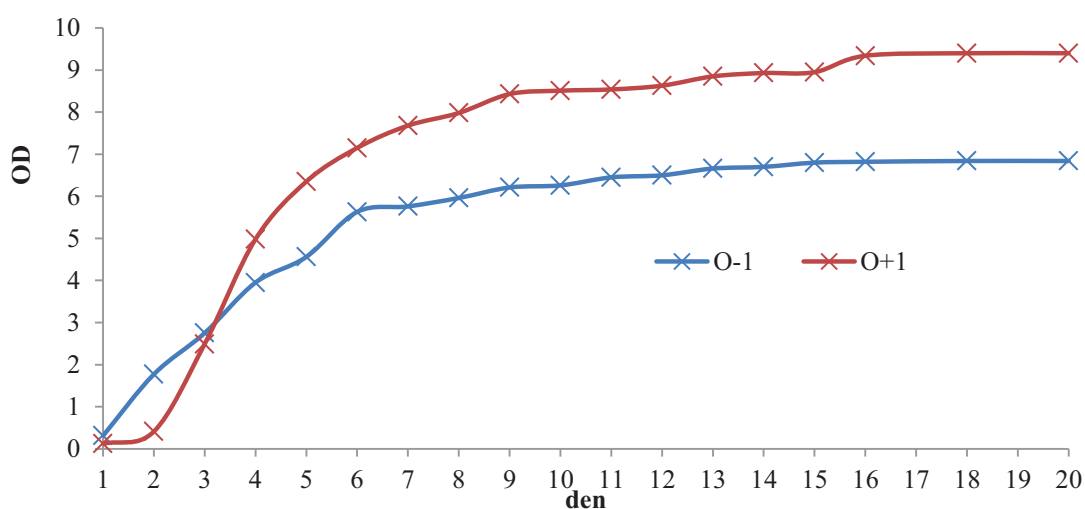
V glukózovém médiu obsahujícím minerální látky se rozmnožovaly všechny kvasinky (viz graf 8) Lag fáze trvala 3 – 6 hodin. Ve srovnání s předchozími glukózovými médii začaly kvasinky odumírat později – 6. den. Výjimkou je kvasinka 1, kde k odumírání docházelo od 4. dne po zaočkování. Kvasinky 3 a 5 rostou s velmi podobným trendem jako komerční kvasinka a zdají se být v tomto prostředí nejlepší.

- *V glukózových médiích se testované kvasinky množily rychle, bez výrazné lag fáze, přičemž fáze odumírání buněk zde nastala ze všech prostředí nejdříve. V nezasířeném moštu se množily všechny kvasinky. Lag fáze zde trvala delší dobu než v případě glukózového média, ale růst byl poměrně rychlý. V případě zasířeného moštu byla schopna růstu pouze komerční kvasinka 1 a autochtonní kvasinka 3. Pokud byly do prostředí přidány živiny, byly po dlouhé adaptaci schopny růstu i kvasinky 2 a 5. Přítomnost SO_2 v prostředí působila na kvasinky blokačním efektem. SO_2 odjímal z prostředí kyslík a kvasinky nebyly schopné se v prostředí množit (viz kap.2.3.5.4). Pokud bylo prostředí obohaceno živinami, kvasinky se na zasířené prostředí lépe adaptovaly. Pro přípravu inokula na zakvácení velkých objemů moštů, se jeví vhodné použít nezasířený mošt. Při přípravě inokula je rozhodující intenzita růstu kvasinek, lze tedy použít i variantu glukózového média, přestože zde byla rychlá úmrtnost. Přídavek živin do média pozitivně ovlivnil růst kvasinek zejména v případě zasířených moštů. Při výběru vhodné kvasinky, záleží na prostředí, ve kterém má kvasinka růst. Pro zasířené prostředí by mohla být použita autochtonní kvasinka 3, do ostatních prostředí by mohla být z hlediska rychlosti množení zvolena kterákoliv z testovaných kvasinek.*

4.6 Sledování osmotolerance kvasinek

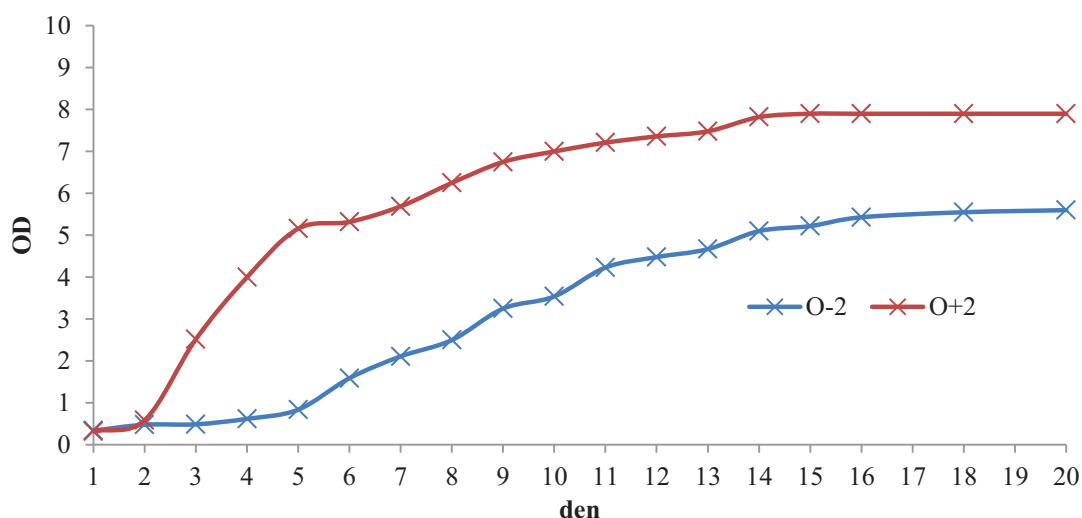
Kvasinky využívané ke kvašení vinných moštů, musejí snášet prostředí s vysokou koncentrací sacharidů. Jedním z kritérií pro výběr vhodné autochtonní kvasinky je tolerance k vyšším koncentracím sacharidů. Za účelem zjištění zda jsou testované kvasinky tolerantní vůči vyšším koncentracím sacharidů, byla provedena kultivace kvasinek v prostředí obsahující 10 % glukózy (O-) a 50 % glukózy (O+). Naměřené hodnoty optické hustoty jsou uvedeny v příloze 8.

Z naměřených hodnot byly nejprve sestrojeny grafy 9 – 13, ve kterých jsou porovnány růstové křivky kvasinky v testovaných prostředích O- a O+. Z těchto grafů plyne, že se všechny testované kvasinky množily v obou prostředích, přičemž ve všech případech bylo dosaženo vyšší koncentrace buněk v prostředí s 50 % glukózy (O+).



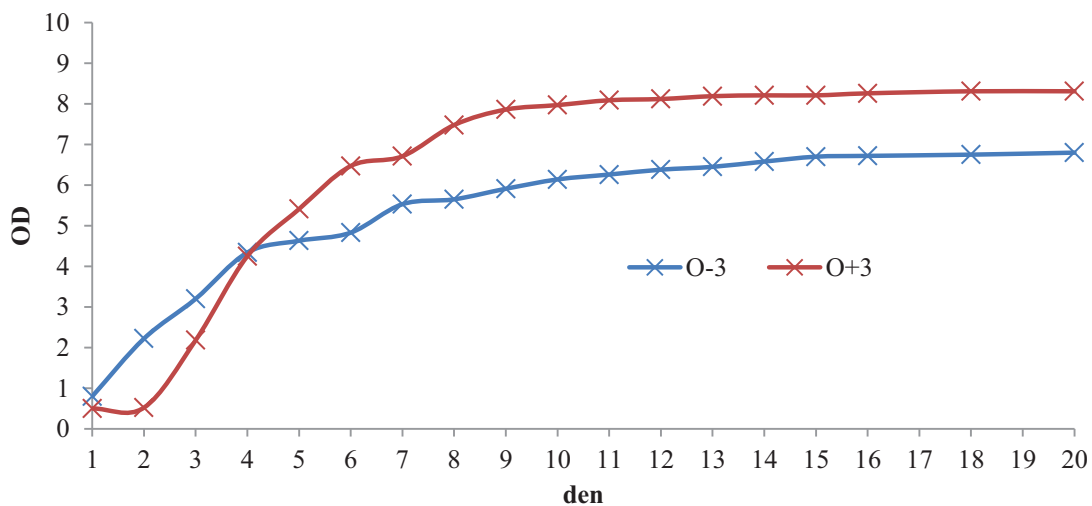
Graf 9: Růstové křivky kvasinky 1

V grafu 9 je možné vidět, že v prostředí O+ trvala lag-fáze do druhého dne, poté se v exponenciální fázi kvasinka množila rychleji než v prostředí O-, ve kterém lag fáze nenastala.



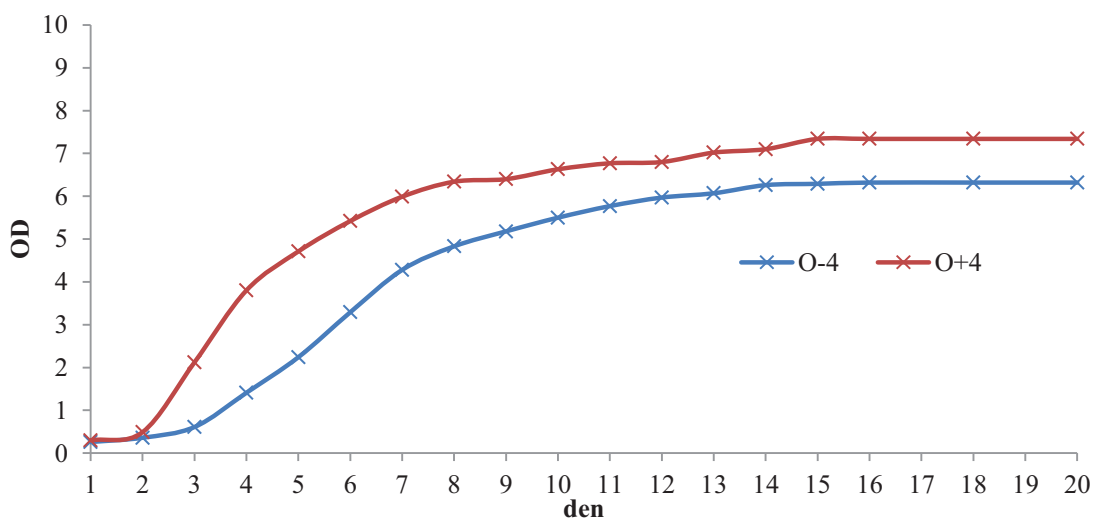
Graf 10: Růstové křivky kvasinky 2

Z grafu 10 je patrné, že kvasinka 2 se stejně jako v předchozím případě nejprve adaptovala na prostředí s vyšší koncentrací glukózy a poté se v něm rozmnožovala rychleji než v prostředí s nižší koncentrací. V prostředí O- je patrná lag- fáze, která trvala do 5. dne.



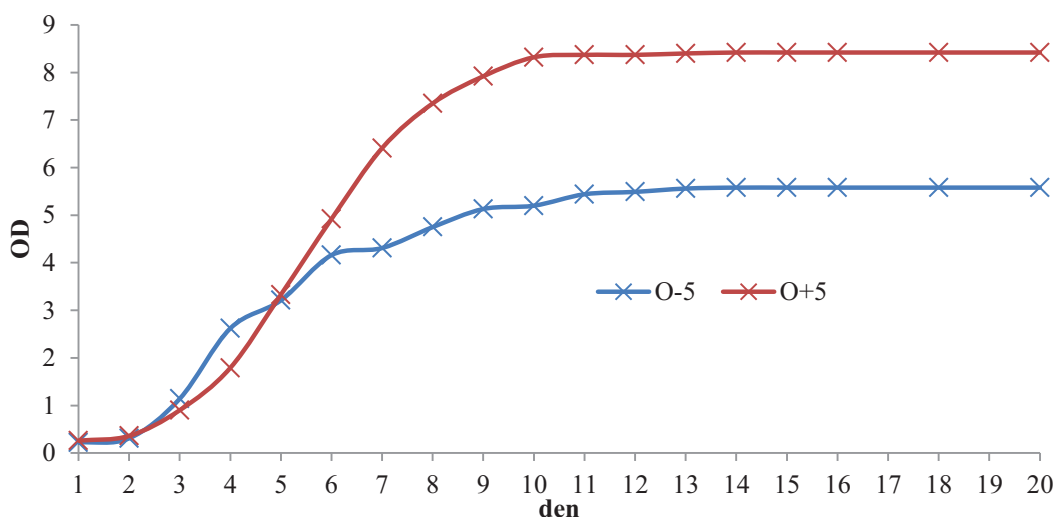
Graf 11: Růstové křivky kvasinky 3

Průběh růstové křivky grafu 11 je srovnatelný s grafem 9. V prostředí O- lag fáze nenastala a v prostředí O+ trvala lag fáze do 2. dne. Ve 4. dni bylo v obou prostředích dosaženo stejné koncentrace buněk, a zatímco v prostředí O- došlo ke zpomalení množení, v koncentrovanějším prostředí se buňky množily intenzivně do 8. dne.



Graf 12: Růstové křivky kvasinky 4

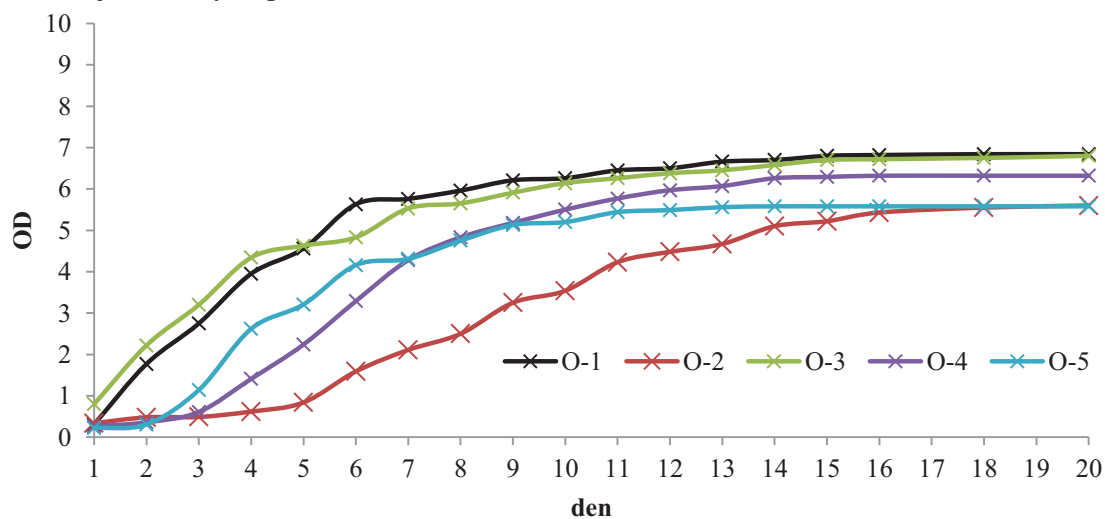
V případě kvasinky 4 v grafu 12 je možné v prostředí O- pozorovat lag fázi trvající do 3. dne a poté pomalejší narůst kvasinek než v prostředí O+, kde lag fáze trvala do 2. dne.



Graf 13: Růstové křivky kvasinky 5

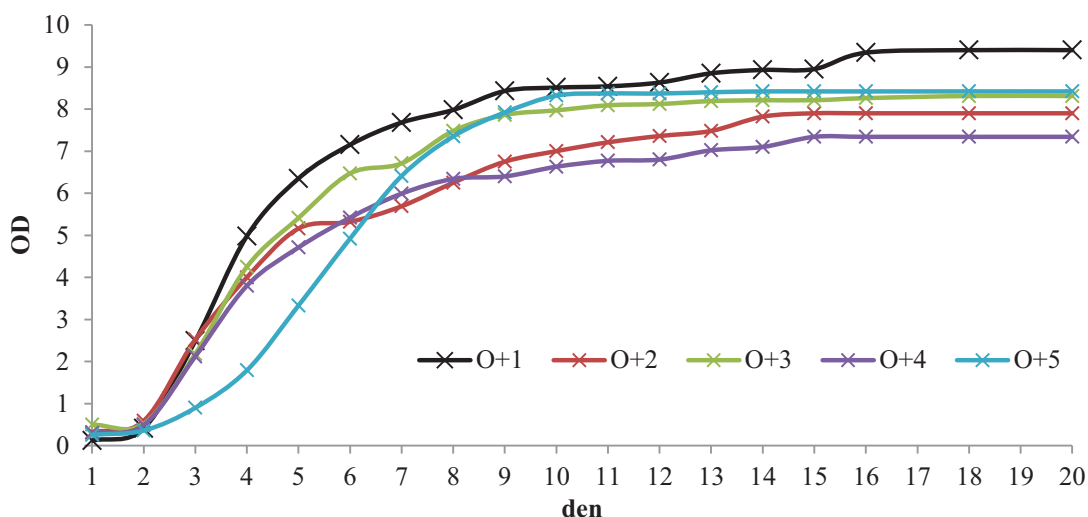
V grafu 13 je možné vidět, že v případě kvasinky 5 trvala lag fáze v obou prostředích do 3. dne. Nejprve byl růst kvasinek intenzivnější v prostředí O-, od 5. dne zde došlo ke zpomalení, zatímco v koncentrovanějším prostředí intenzivní růst pokračoval.

Výsledky tohoto testování, které jsou znázorněny v grafech 9 – 13 byly následně přehledně zhodnoceny v grafech 14 a 15, kde jsou porovnány růstové křivky všech testovaných kvasinek v jednotlivých prostředích.



Graf 14: Růstové křivky kvasinek v prostředí O-

V grafu 14 jsou znázorněny růstové křivky všech kvasinek v prostředí O-. U kvasinek 1 a 3 nenastala lag fáze, tyto kvasinky se začaly ihned rozmnožovat. Nejdélejší lag fáze byla v případě kvasinky 2. Kvasinky 1 a 2 rostly v prostředí do 18 dne, kvasinka 4 rostla do 16. dne, nejkratší dobu rostla kvasinka 5, a to do 14. dne. Nejdéle rostla kvasinka 3, která rostla i v den ukončení testu – 20. den



Graf 15: Růstové křivky kvasinek v prostředí O+

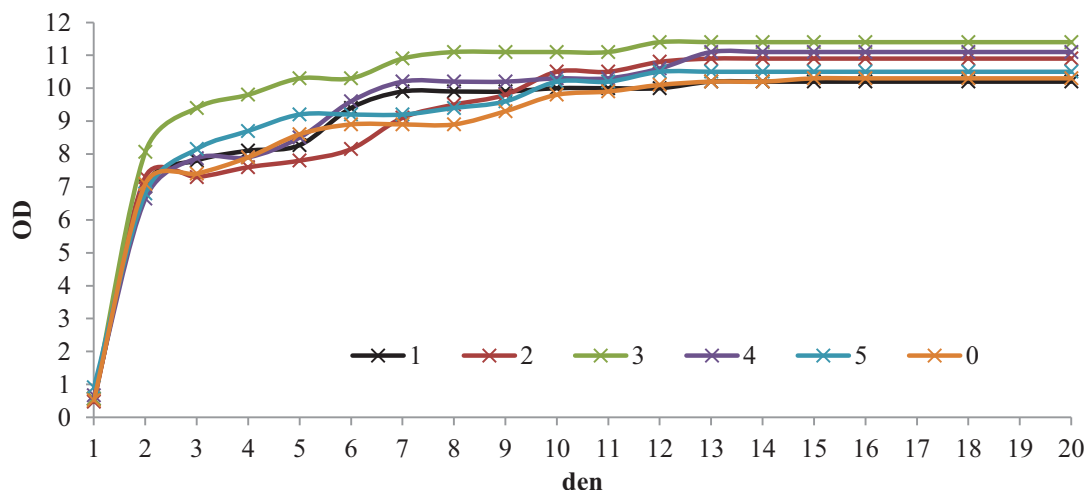
Rozmnožování kvasinek v prostředí O+ bylo intenzivnější, než v prostředí O- (viz graf 15). Lag fáze nastala v případě všech kvasinek a trvala do 3. dne v případě kvasinky 5. U všech ostatních kvasinek trvala adaptace na prostředí do 2. dne. Lag fázi následovala intenzivnější exponenciální fáze, při které bylo dosaženo vyšších koncentrací buněk než v prostředí O-. Nejdéle v tomto prostředí rostla kvasinka 1 a 3.

- *Vyšší koncentrace sacharidů nezpůsobila výrazné snížení životnosti kvasinek, naopak došlo k rychlejšímu nárůstu buněk. Z tohoto pohledu se všechny testované kvasinky jeví jako osmotolerantní a vhodné pro kvašení vinných moštů. Jako nejvhodnější se jeví kvasinka 3, která v obou prostředích rostla nejrychleji a nejdelší dobu.*

4.7 Sledování tolerance kvasinek k alkoholu

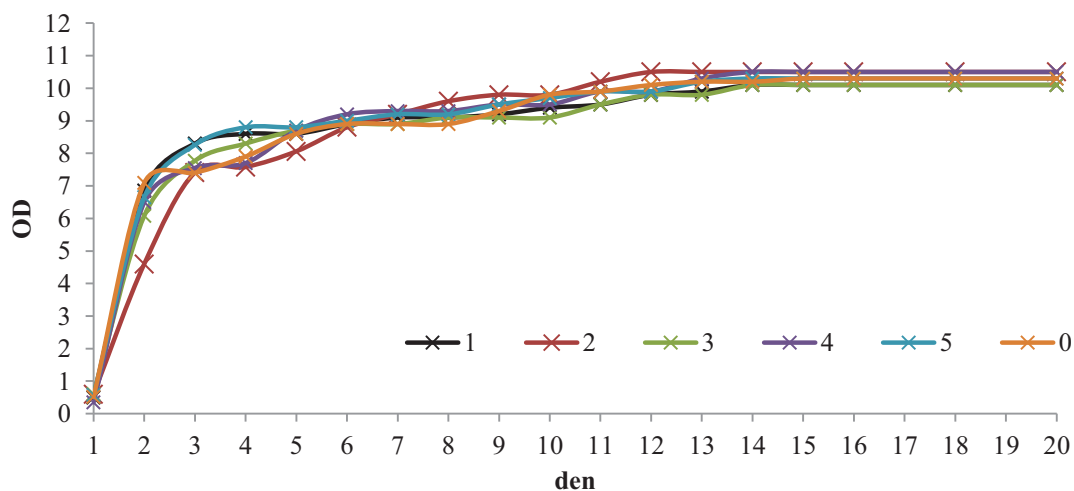
Alkohol, který vzniká při kvašení, omezuje činnost kvasinek. V závislosti na druhu jsou kvasinky různě odolné vůči různým koncentracím alkoholu (viz kapitola 2.3.7.1). Dalším parametrem pro výběr vhodné kvasinky pro kvašení je tedy schopnost růstu v prostředí obsahující určité množství alkoholu.

Za účelem zjištění, zda a při jaké koncentraci jsou schopné kvasinky růstu, byla provedena kultivace v prostředí obsahující 1 %, 4 %, 8 %, 12 %, 16 % a 18 % ethanolu. Pro srovnání byla provedena kultivace kvasinky 1 (komerční) v prostředí bez alkoholu, tato kvasinka je v grafech označena jako 0. Každý den ve stejnou dobu byla měřena optická hustota. Z naměřených hodnot, které jsou uvedeny v příloze 9, byly sestrojeny růstové křivky (viz graf 16 – 21).



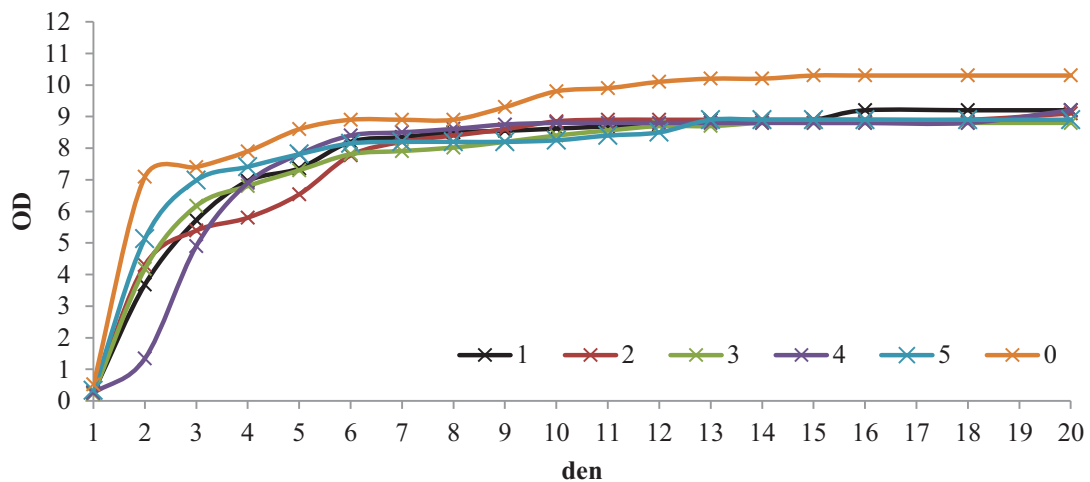
Graf 16: Růstové křivky kvasinek (1 % ethanolu)

V grafu 16 jsou znázorněny růstové křivky kvasinek v prostředí obsahujícím 1 % ethanolu. Kvasinky se množily od 1. dne, v grafu není patrná lag fáze. Kromě kvasinky 1, která dosáhla stejné koncentrace buněk jako kvasinka v prostředí s 0 % ethanolu, dosáhly všechny testované kvasinky vyšší koncentrace buněk. Nejrychleji se v prostředí množila kvasinka 3. Kvasinky 1, 2 a 4 se množily do 13. dne, kvasinky 3 a 5 do 12. dne. Kvasinka 0 v prostředí bez ethanolu rostla do 15. dne. Je možné říci, že 1 % ethanolu nemělo na kvasinky významný negativní vliv.



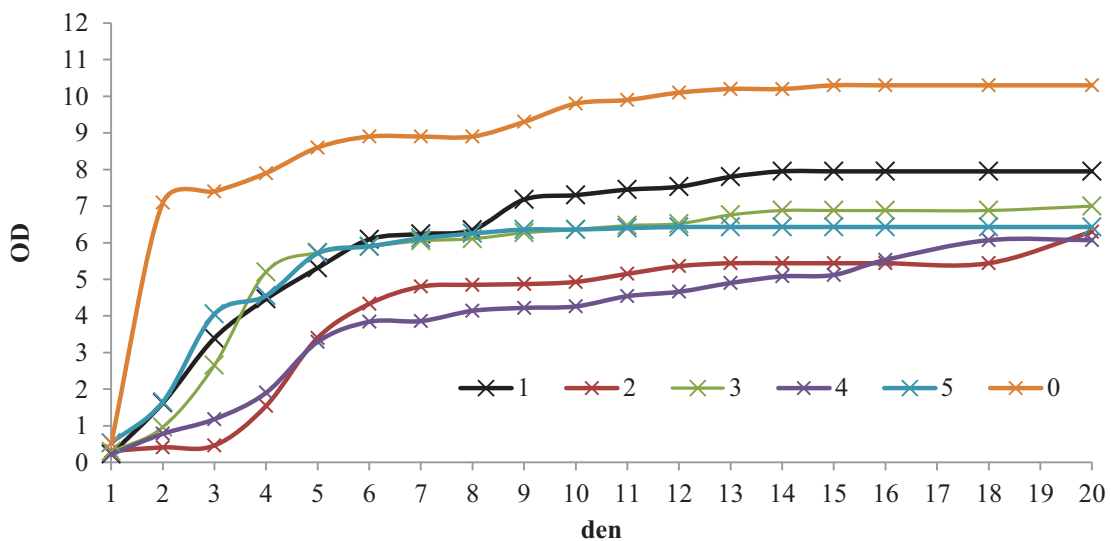
Graf 17: Růstové křivky kvasinek (4 % ethanolu)

Na základě grafu 17 je možné říci, že v prostředí, které obsahovalo 4 % ethanolu, se kvasinky množily s velmi podobným trendem, jako kvasinka která rostla v prostředí bez ethanolu. Kvasinky 1, 3, 5 rostly déle – do 14. dne, kvasinky 2 a 4 dosáhly mírně vyšších hodnot koncentrace buněk. Je možné říci, že 4 % ethanolu nemělo na kvasinky významný negativní vliv.



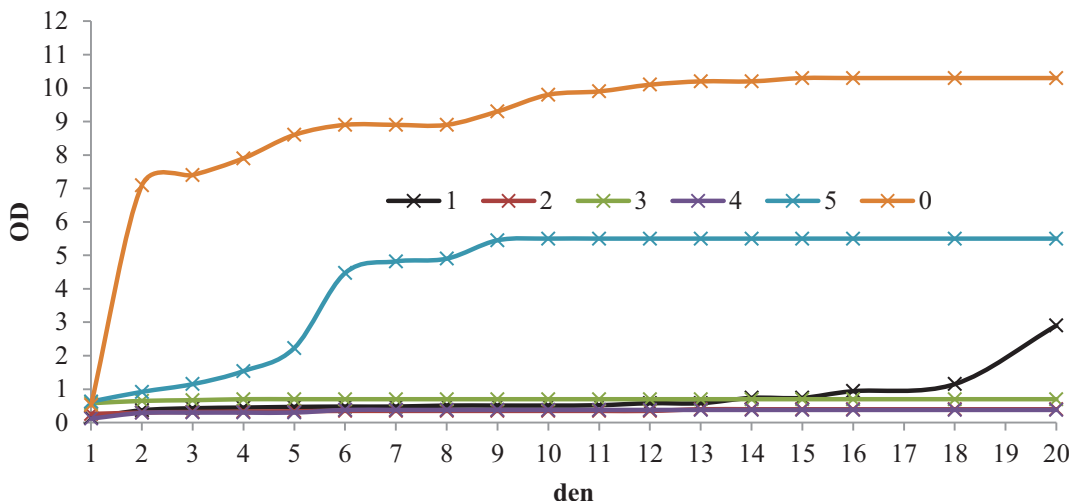
Graf 18: Růstové křivky kvasinek (8 % ethanolu)

Z grafu 18 je patrné, že koncentrace 8 % ethanolu v prostředí, již mírně brání růstu kvasinek. Kvasinky zde rostly pomaleji než v prostředí s nižší koncentrací ethanolu nebo v prostředí bez ethanolu. V počáteční fázi nejrychleji rostla kvasinka 5, která spolu s kvasinkou 1 rostla nejdéle, a to do 13. dne. Co se týká koncentrace buněk, dosahuje u všech kvasinek podobných hodnot. Tyto hodnoty jsou nižší než koncentrace buněk v prostředí bez ethanolu.



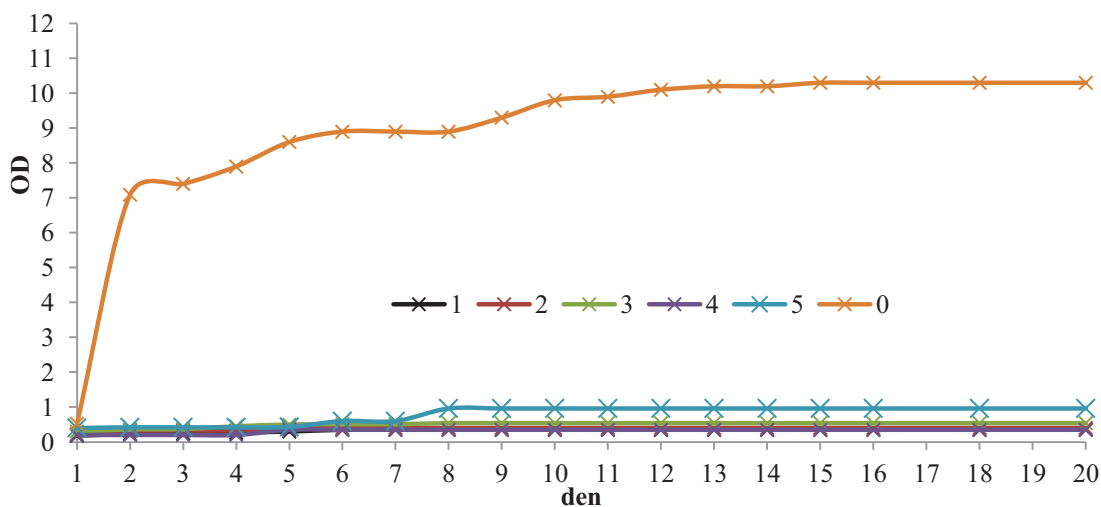
Graf 19: Růstové křivky kvasinek (12 % ethanolu)

V grafu 19 je patrný vliv ethanolu na růst kvasinek. V prostředí s 12 % ethanolu se kvasinky množily pomaleji než v předchozích případech. U kvasinek 2 a 4 je patrná delší adaptace na prostředí, tyto kvasinky dorostly do nižších koncentrací. Kvasinka 5 rostla na počátku nejrychleji, později je viditelný intenzivnější růst kvasinky 1 a 3. Tyto kvasinky rostly nejdéle, odumírat začaly od 14. dne.



Graf 20: Růstové křivky kvasinek (16 % ethanolu)

V prostředí s 16 % ethanolu rostla pouze kvasinka 5 (viz graf 20). Růst kvasinky byl pozvolný, trval do 13. dne a mezi 5. a 6. dnem byl růst nejintenzivnější. Od 16. dne je možné pozorovat mírný nárůst kvasinky 1, z důvodu velmi dlouhé adaptace na prostředí je tato kvasinka prostředí nevyhovující a jako vyhovující se jeví pouze kvasinka 5.



Graf 21: Růstové křivky kvasinek (18% ethanolu)

V grafu 21 je možné pozorovat, že v prostředí obsahující 18 % ethanolu není schopna růst ani jedna z kvasinek. Nepatrný nárůst buněk lze pozorovat u kvasinky 5 mezi dnem 7 a 8, což potvrzuje skutečnost, že kvasinka 5 je schopná se adaptovat na prostředí s vyšším množstvím ethanolu a v tomto prostředí se rozmnožovat.

- V prostředí obsahujícím 1 % a 4 % ethanolu jsou testované kvasinky schopny růst minimálně stejně intenzivně jako v prostředí bez ethanolu. Při vyšších koncentracích ethanolu byl vliv na růst kvasinek znatelný.

Za kvasinku nejodolnější k vyšším koncentracím ethanolu a tedy i nejvhodnější pro využití v kvasném procesu, lze považovat kvasinku 5, která byla jako jediná schopna se množit i v prostředí s 16 % ethanolu a její nepatrný nárůst byl zaznamenán i v prostředí s 18 % ethanolu. Jako vhodnou pro výrobu vína lze z hlediska tolerance k alkoholu považovat také kvasinku 3, která se v prostředí s obsahem 8 a 12 % ethanolu intenzivně množila.

4.8 Sledování průběhu fermentace

Za účelem výběru nejvhodnější kvasinky pro výrobu vína, byly kvasinkami fermentovány vinné mošty získané od spolupracujících vinařů (viz kapitola 3.1). Byly použity dva různé vinné mošty, kdy jeden byl zasiřený a druhý nezasířený. Do moštů byly na začátku a v průběhu fermentace přidány živiny (viz kap. 3.3.1), tak jak je to běžné ve vinařské praxi. Tyto živiny také poskytli spolupracující vinaři.

Fermentace byla sledována z hlediska dvou parametrů: Bylo provedeno stanovení uvolněného CO₂ v průběhu kvašení a stanovení redukujících sacharidů v moštu v průběhu kvašení.

Pro fermentaci byla připravena tato prostředí:

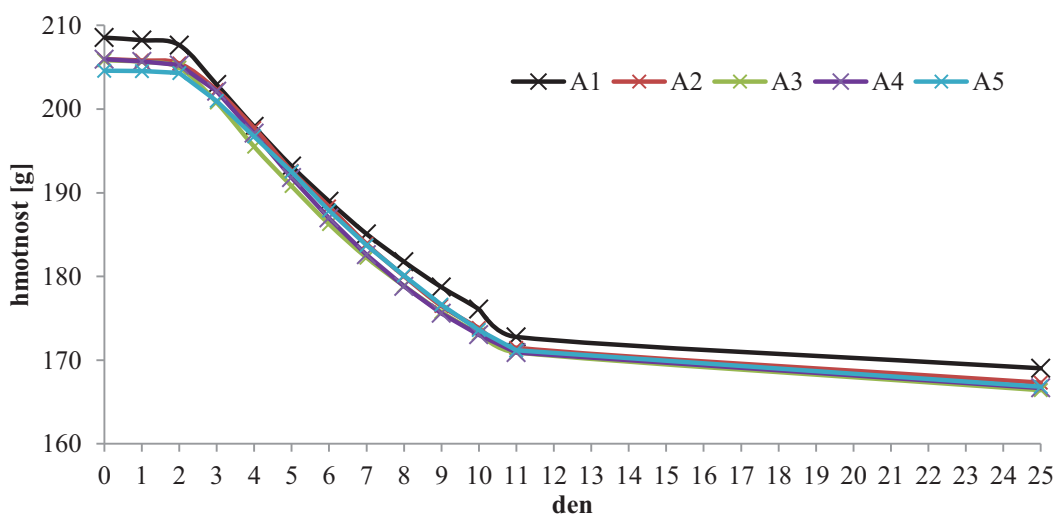
- Prostředí A – vinný mošt, pasterizovaný, mírně zasiřený
- Prostředí K – vinný mošt, pasterizovaný, nezasířený
- Prostředí A+ – vinný mošt s přidavkem živin, pasterizovaný, mírně zasiřený
- Prostředí K+ – vinný mošt s přidavkem živin pasterizovaný, nezasířený

200 ml každého média bylo zaočkováno 0,5 ml suspenze dvoudenní kultury kvasinek. Fermentace probíhala po dobu 25 dnů, při teplotě 19 °C. Prvních 11 dní byla denně změřena hmotnost média a odebrán vzorek média pro stanovení redukujících sacharidů. Poslední měření a odběr vzorku proběhl po 14 denní pauze, tedy 25. den po zaočkování. Přídavek živin byl proveden před zaočkováním a 3. a 8. den po zaočkování média s označením A+ a K+.

4.8.1 Stanovení množství uvolněného CO₂

Výsledky měření byly zpracovány třemi způsoby. V prvním případě (viz 4.8.1.1) byl sledován úbytek hmotnosti jednotlivých fermentačních médií. Dále byly z naměřených hodnot hmotností médií vypočítány a graficky zpracovány změny hmotnosti způsobené uvolněným CO₂ (viz 4.8.1.2) a dále porovnáním množství uvolněného CO₂ v jednotlivých prostředích, byl pozorován vliv přídavku živin na metabolickou činnost kvasinek (viz 4.8.1.3). Tabulky s výsledky měření jsou uvedeny v přílohách 10 a 12.

4.8.1.1 Hmotnost média v průběhu fermentace

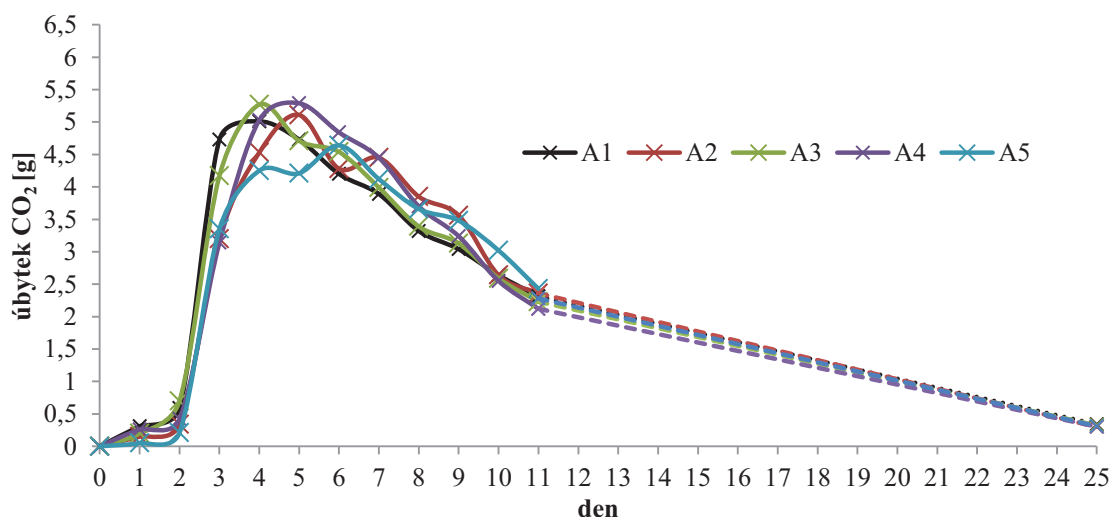


Graf 22: Hmotnost média v jednotlivých dnech – prostředí A

V grafu 22 je znázorněna hmotnost média v jednotlivých dnech fermentace testovaného prostředí A. K nejintenzivnějšímu úbytku hmotnosti došlo mezi 3. a 11. dnem, toto období odpovídá nejbouřlivější fázi fermentaci. Mezi 11. a 25. dnem metabolická aktivita kvasinek zpomalila a došlo pouze k minimální změně hmotnosti média. Grafy znázorňující úbytek hmotnosti při fermentaci ostatních prostředí, které jsou uvedeny v příloze 11, mají velmi podobný trend.

4.8.1.2 Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých prostředích

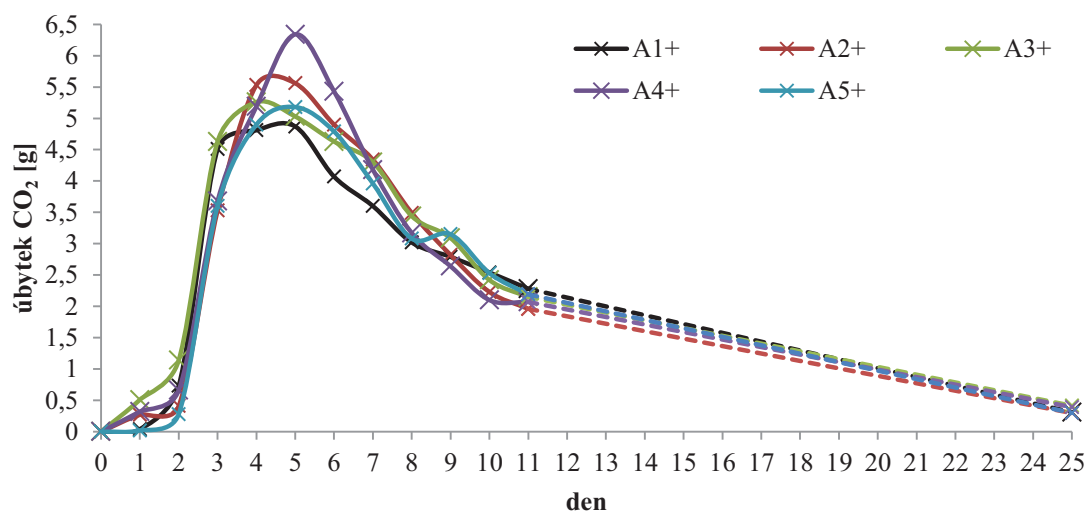
Úbytek CO₂ odpovídající intenzitě fermentace je dokumentován grafy 23 – 26 pro jednotlivá testovaná fermentační prostředí.



Graf 23 Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – prostředí A

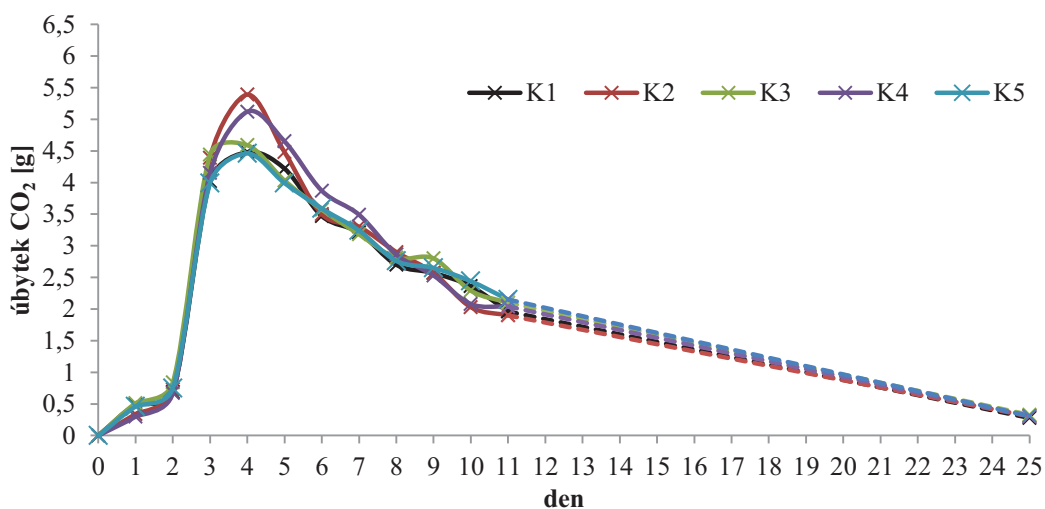
V grafu 23 je znázorněn průběh fermentace v prostředí zasířeného moštu bez přidavku živin. K nejvyššímu úbytku CO₂ a tedy k nejintenzivnější fermentaci došlo metabolickou činností kvasinek 3 a 4, tato maxima byla zaznamenána 4. resp. 5. den po zaočkování.

V případě kvasinky 2, 3 a 4 byl průběh fermentace intenzivnější, než v případě komerční kvasinky.



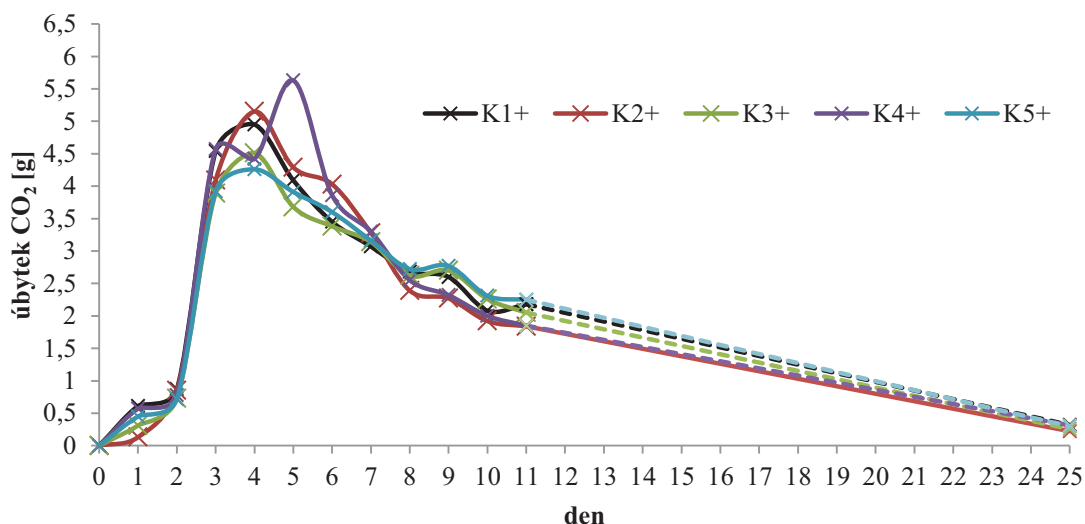
Graf 24: Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – prostředí A+

V zasiřeném prostředí moštu s přidavkem živin došlo k nejvyššímu uvolnění CO₂ 5. den v případě kvasinky 4 (viz graf 24). Z grafu je patrné, že metabolická činnost autochtonních kvasinek byla v moštu s přidavkem živin vyšší, než metabolická činnost komerční kvasinky.



Graf 25: Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – prostředí K

V grafu 25 je znázorněn průběh fermentace v prostředí nezasířeného moštu bez přidavku živin. Nejvyšší množství uvolněného CO₂ bylo zaznamenáno v případě metabolické činnosti kvasinek 2 a 4, zatímco průběh fermentace kvasinkami 5 a 3 měl podobný trend jako průběh fermentace komerční kvasinkou.

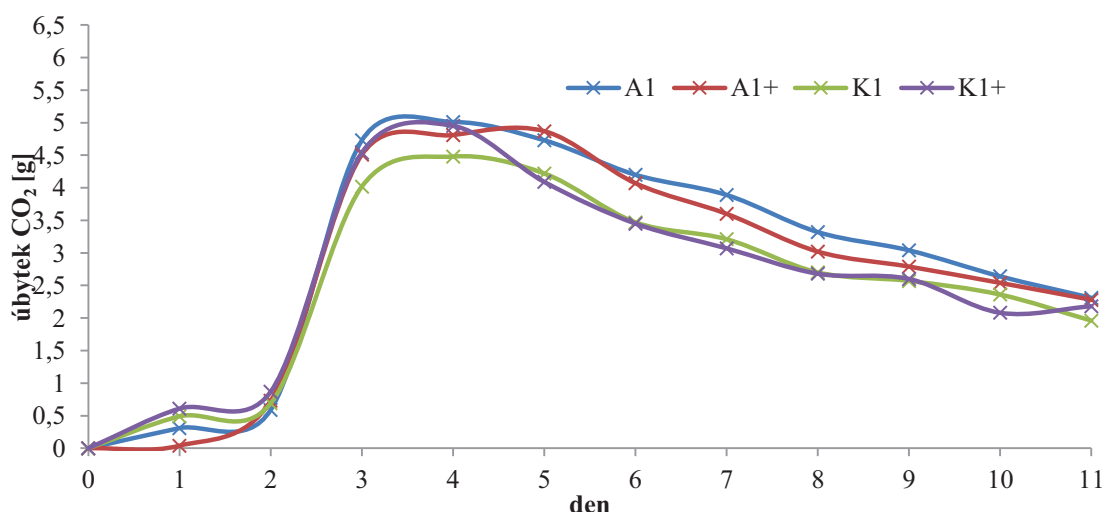


Graf 26: Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – prostředí K+

V grafu 26 je možné pozorovat průběh fermentace v prostředí nezasířeného moštu s přidavkem živin. Fermentace probíhala podle předpokladů – v grafu v příloze 11 je tedy možné vidět postupné snížení hmotnosti média, podobně jako v grafu 23. K nejintenzivnějšímu uvolnění CO₂ do prostředí došlo 4. a 5. den fermentace v případě metabolické činnosti kvasinek 4 a 5. Jak bude popsáno dále, tato zvýšená intenzita fermentace má spojitost s přidavkem živin do média ve 3. dni fermentace.

4.8.1.3 Vliv přidavku živin na průběh fermentace

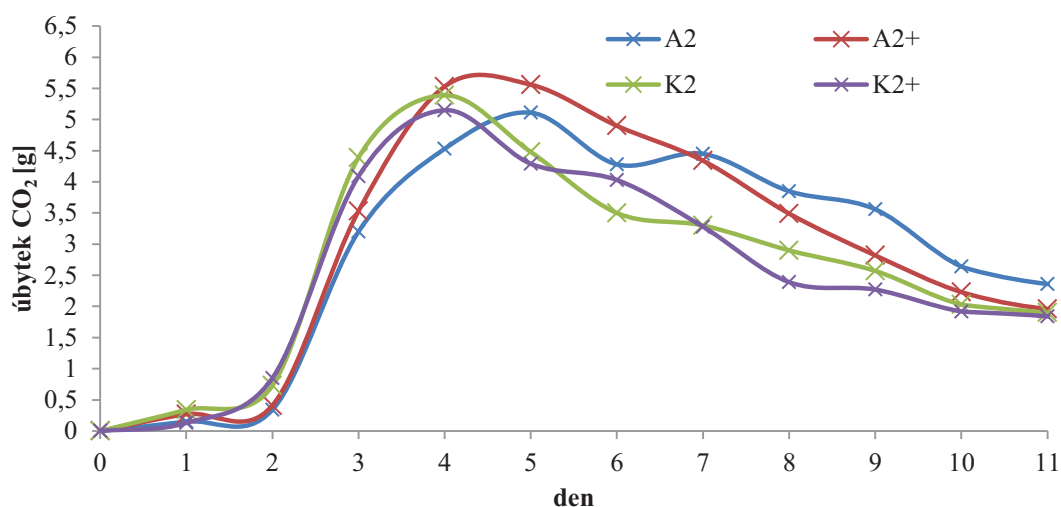
Pro přehlednější porovnání vlivu přidavku živin do média na metabolickou činnost kvasinek byly sestaveny grafy 27 – 31, kde je znázorněn nejintenzivnější průběh fermentace (do dne 11) jednou kvasinkou v různých prostředích.



Graf 27: Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – kvasinka 1

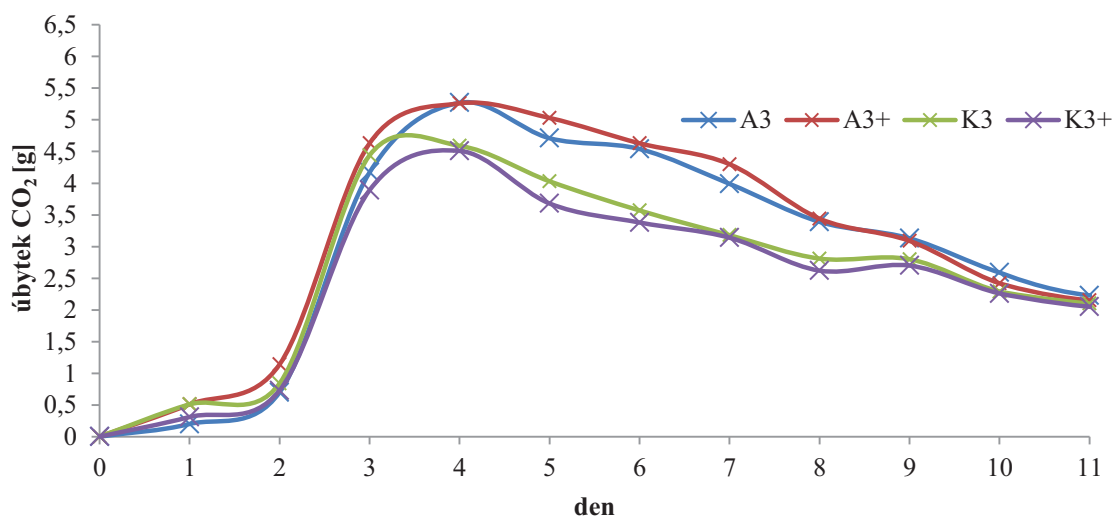
V grafu 27 je znázorněn průběh fermentace testované komerční kvasinky 1 v různých prostředích. Přídavek živin ovlivnil průběh fermentace v prostředí K, kdy v 1. dni došlo k vyššímu uvolnění CO₂, stejně tak je možné pozorovat vyšší intenzitu fermentace ve dni 4. Následně již probíhala fermentace téměř stejně a přidavek živin v 8. dni neměl na kvasinku

výrazný vliv. V prostředí A se projevila přidávka živin ve dni 5, kdy se intenzita fermentace mírně zvýšila, zatímco v prostředí bez přidavku se už intenzita fermentace postupně snižovala.



Graf 28: Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – kvasinka 2

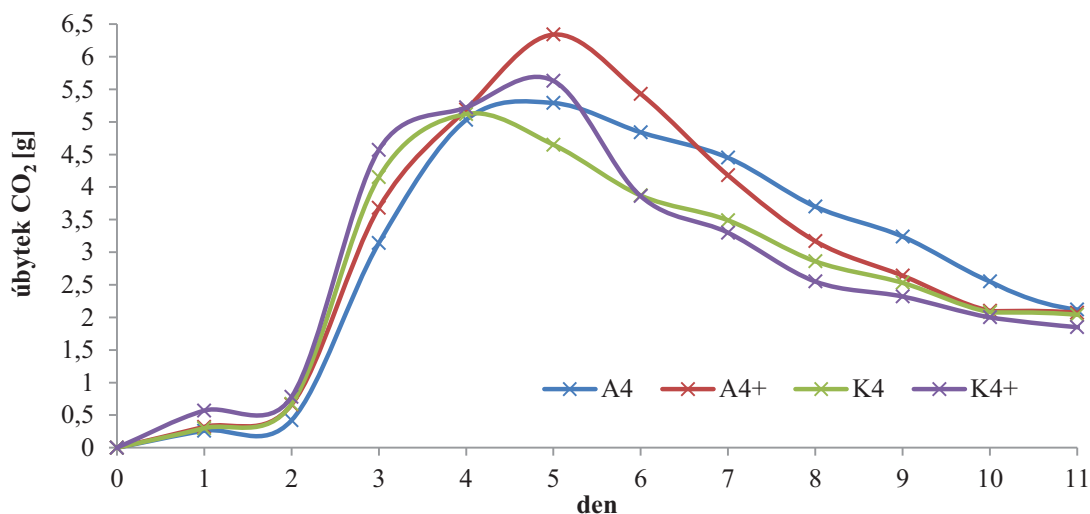
V grafu 28 je znázorněn průběh fermentace testovanou kvasinkou 2. V prostředí A+ je možné pozorovat vyšší intenzitu fermentace do dne 7, což koresponduje s přidávku živin na počátku a 3. den fermentace. V případě prostředí K+ není do 6. dne patrný vliv přidavku živin. Mírné zvýšení intenzity fermentace ve dnech 6 a 9 mohlo být zapříčiněno přidavky živin ve dnech 3 a 8.



Graf 29: Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – kvasinka 3

V grafu 29 je znázorněn průběh fermentace v jednotlivých prostředích testovanou kvasinkou 3. V případě fermentace zasířeného moštu A byl vliv přidavku živin znatelný zejména na počátku, kdy měla fermentace rychlejší průběh. Maximální úbytek CO₂ byl v obou prostředích pozorován v den 4, intenzita fermentace se v případě přidavku živin snižovala mírněji, než v případě moštu bez živin.

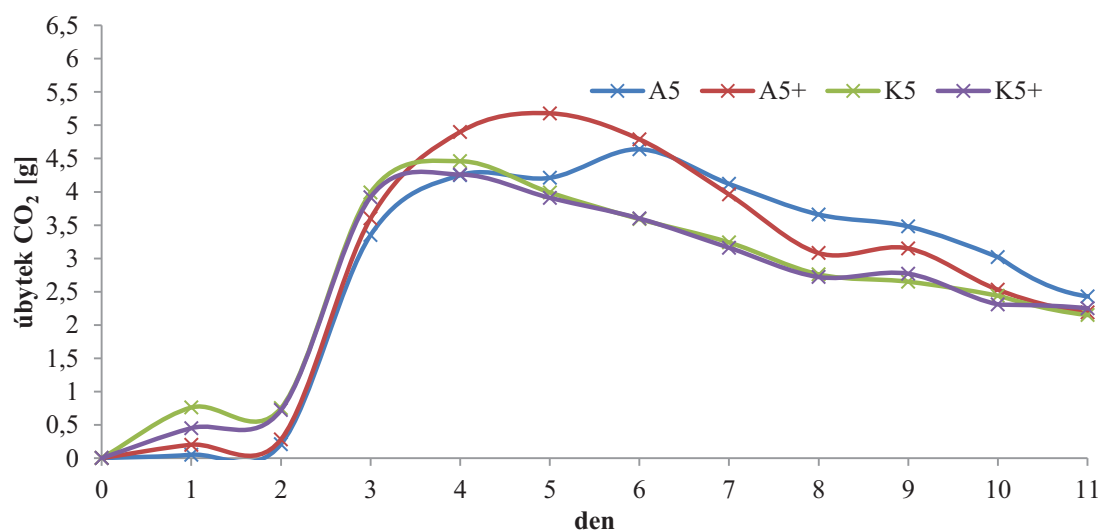
Z grafu 29 je patrné, že počáteční přídavek živin do prostředí nezasířeného moštu, neměl na počáteční průběh fermentace vliv. V případě křivky K3+ je patrný vliv přídavku živin z 8. dne, kdy 9. den došlo k mírnému zvýšení intenzity fermentace.



Graf 30: Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – kvasinka 4

V případě přídavku živin do prostředí zasířeného moštu A, je v grafu 30 vidět, že testovaná kvasinka 4 od počátku fermentovala intenzivněji, než v případě prostředí moštu bez přídavku živin. Přídavek živin v 3. den fermentace způsobil prodloužení exponenciální fáze do 5. dne a následně prudší zpomalení fermentace, než v moštu A, kde metabolická činnost kvasinek ustávala postupně.

V moštu K+ způsobil přídavek živin rychlejší adaptaci kvasinky na prostředí moštu a přídavek ve 3. dni způsobil prodloužení exponenciální fáze do 5. dne. Poté došlo k poklesu intenzity fermentace a od 6. dne byla metabolická činnost testované kvasinky nižší, než v moštu K.



Graf 31: Množství uvolněného CO₂ v jednotlivých dnech – kvasinka 5

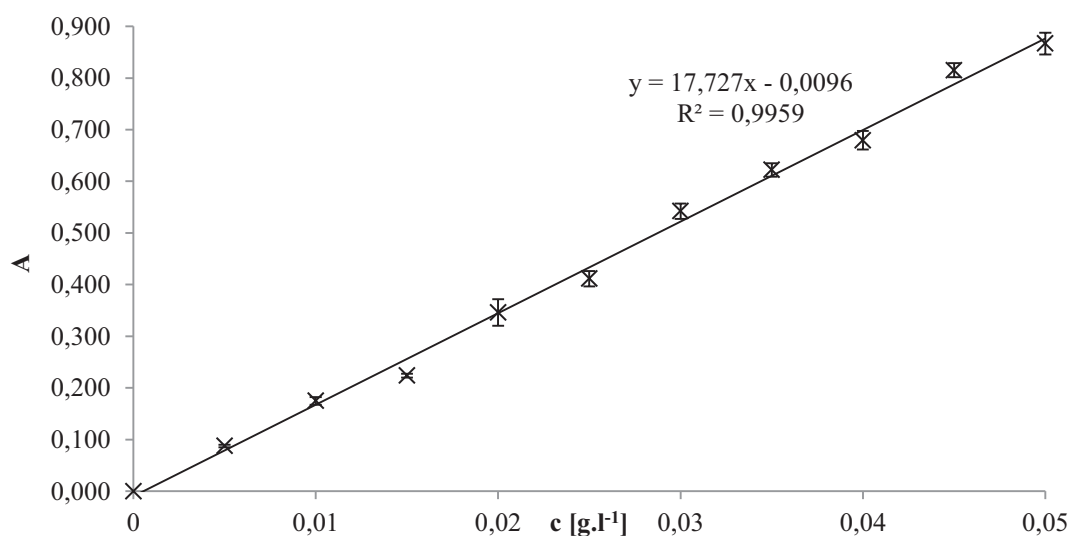
V grafu 31 je znázorněn průběh fermentace testovanou kvasinkou 5. Na počátku fermentace je znatelný vliv přídatku živin pouze v případně zasiřeného moštu A. Přídatok v 3. dni fermentace ovlivnil průběh fermentace také pouze v případě zasiřeného moštu A, a to 4. a 5. den, kdy byla intenzita fermentace značně vyšší. Vliv přídatku živin z 8. dne je patrný u obou moštů A i K. Přídatok se projevil 9. den zvýšeným úbytkem CO₂.

4.8.2 Stanovení redukujících sacharidů podle Somogyiho-Nelsona

Stanovení redukujících sacharidů bylo provedeno metodou Smogyiho-Nelsona, jejíž postup byl popsán v kapitole 4.8.2. Koncentrace redukujících sacharidů byla stanovena pomocí sestavené kalibrační křivky (viz graf 32). Kalibrační křivka představuje závislost koncentrace glukózy na absorbanci, měřené při vlnové délce 720 nm. Tato křivka byla sestavena z výsledků měření uvedených v tabulce 13. Stanovení vzorků pro sestavení kalibrační křivky bylo provedeno pětkrát, byly vypočítány průměrné hodnoty absorbance a pomocí programu MS Excel byl vypočítán interval spolehlivosti, který byl vnesen do grafu v podobě chybových úseček.

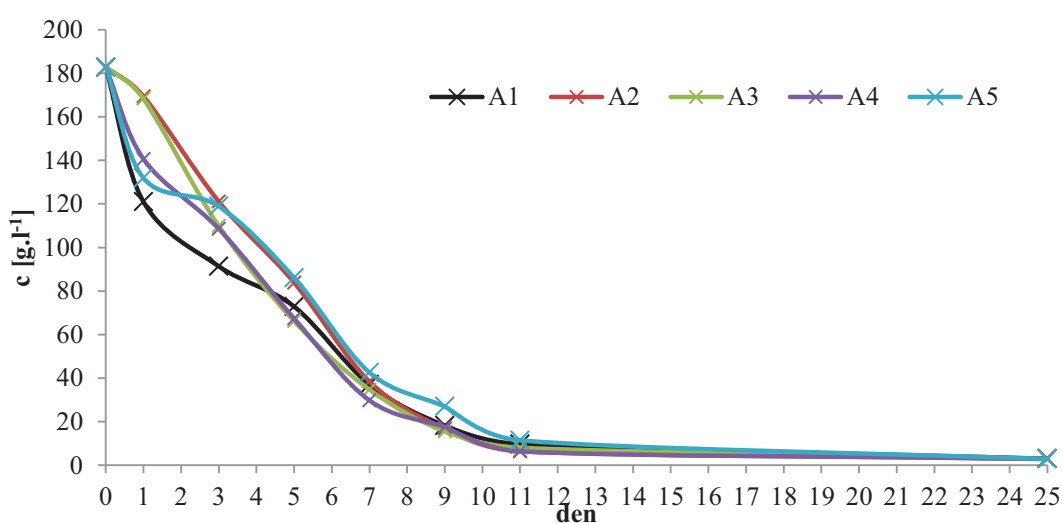
Tabulka 13: Koncentrace glukózy a absorbance kalibrační křivky

c [g.l ⁻¹]	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000 ± 0,000
0,005	0,087	0,088	0,083	0,088	0,092	0,088 ± 0,003
0,010	0,167	0,188	0,174	0,165	0,180	0,175 ± 0,007
0,015	0,230	0,225	0,219	0,219	0,226	0,224 ± 0,004
0,020	0,292	0,346	0,378	0,362	0,352	0,346 ± 0,026
0,025	0,422	0,391	0,408	0,438	0,398	0,411 ± 0,015
0,030	0,542	0,538	0,561	0,557	0,513	0,542 ± 0,015
0,035	0,629	0,606	0,647	0,612	0,616	0,622 ± 0,013
0,040	0,640	0,687	0,695	0,680	0,695	0,679 ± 0,018
0,045	0,788	0,817	0,830	0,830	0,810	0,815 ± 0,014
0,050	0,875	0,861	0,908	0,837	0,853	0,867 ± 0,021



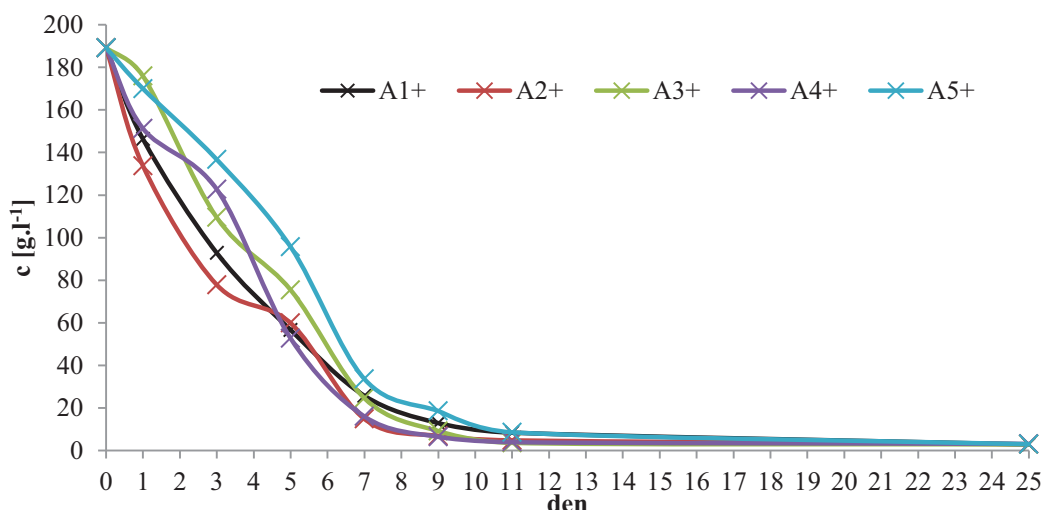
Graf 32: Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci redukujících sacharidů

Ke stanovení redukujících sacharidů byly použity vzorky odebrané v průběhu fermentace médií A, A+, K, K+ testovanými kvasinkami 1 – 5. Odebrané vzorky byly nejprve vhodně zředěny (viz příloha 13) a poté bylo provedeno stanovení. Každé stanovení bylo provedeno třikrát. Naměřené hodnoty absorbance byly pomocí rovnice regrese kalibrační křivky přepočteny na koncentrace redukujících sacharidů. Byla vypočtena průměrná hodnota koncentrace a pomocí programu MS Excel byl vypočítán interval spolehlivosti. Tabulky s výsledky jsou uvedeny v příloze 8 a závislost koncentrace redukujících sacharidů na čase je znázorněna v grafech 33 – 36. Chybové úsečky v grafech nebyly v tomto případě vyobrazeny z důvodu přehlednosti grafů, hodnoty intervalu spolehlivosti jsou uvedeny pouze v tabulce s výsledky v příloze 13.



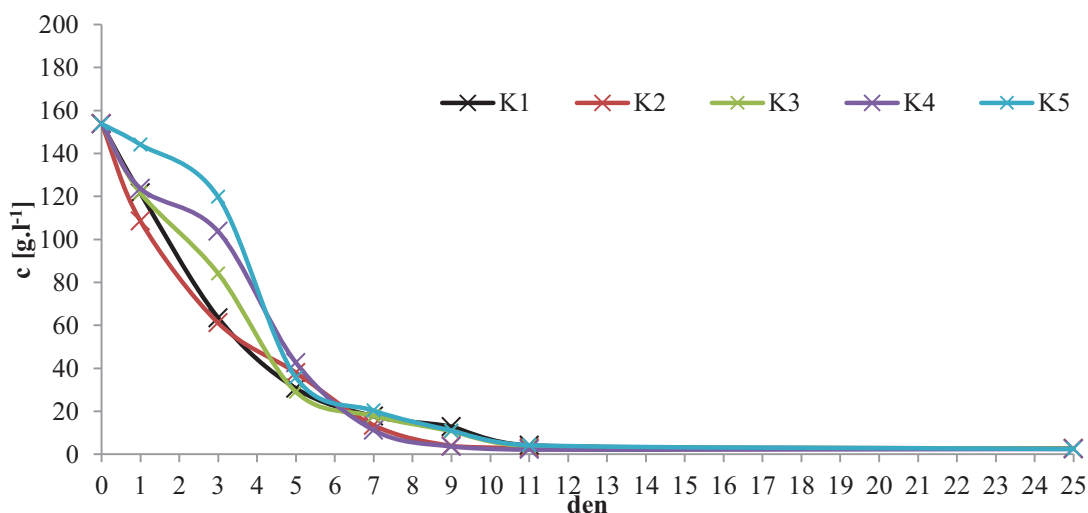
Graf 33: Závislost koncentrace redukujících sacharidů na čase – prostředí A

V grafu 33 je znázorněn pokles koncentrace redukujících sacharidů v průběhu kvašení zasyřeného moštu A testovanými kvasinkami 1 – 5. Výchozí koncentrace moštu byla $182,8 \text{ g.l}^{-1}$. Metabolickou činností kvasinek 1 – 4 výrazně klesala koncentrace redukujících sacharidů do 9. dne kvašení moštu, v případě kvasinky 5 klesala koncentrace redukujících sacharidů výrazněji do 7. dne. Poté se koncentrace redukujících sacharidů snižovala mírně a konečná koncentrace v den ukončení fermentace se pohybovala mezi $2,8 - 3,0 \text{ g.l}^{-1}$. Porovnáním jednotlivých křivek v grafu je možné říci, že k nejvyššímu a nejrychlejšímu úbytku koncentrace redukujících sacharidů docházelo činností kvasinky 3 a 4, což koresponduje s výsledky v grafu 22 v kapitole 4.8.



Graf 34: Závislost koncentrace redukujících sacharidů na čase – prostředí A+

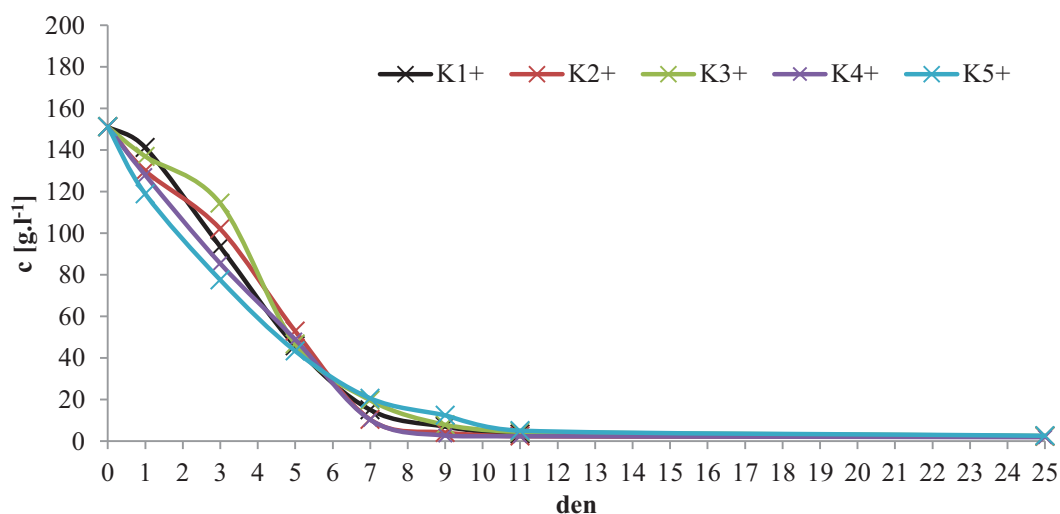
V grafu 34 je znázorněn pokles koncentrace redukujících sacharidů v průběhu kvašení zasyřeného moštu A+ testovanými kvasinkami 1 – 5. Výchozí koncentrace moštu byla 189,1 g.l⁻¹. Činností kvasinek došlo k výraznému snížení koncentrace redukujících sacharidů do 7. dne kvašení, poté se koncentrace redukujících sacharidů snižovala mírně. Poslední den fermentace se koncentrace redukujících sacharidů pohybovala v rozmezí 2,8 – 3,1 g.l⁻¹. Z grafu 34 je patrné, že k nejrychlejšímu úbytku docházel činností kvasinek 2 – 4, což odpovídá výsledkům v kapitole 4.8., kde byla zjištěna nejintenzivnější metabolická činnost těchto kvasinek. V případě kvasinek 3 a 5 je počáteční úbytek koncentrace redukujících sacharidů pomalejší, pravděpodobně z důvodu adaptace na podmínky v prostředí moštu.



Graf 35: Závislost koncentrace redukujících sacharidů na čase – prostředí K

V grafu 35 je znázorněn pokles koncentrace redukujících sacharidů v průběhu kvašení nezasyřeného moštu K testovanými kvasinkami 1 – 5. Počáteční koncentrace redukujících sacharidů v moštu byla 153,8 g.l⁻¹. Činností kvasinek 1, 3 a 5 došlo k nejvýraznějšímu snížení koncentrace redukujících sacharidů do 5. dne, v případě kvasinek 2 a 4 se koncentrace snižovala až do 7. dne. Poté se koncentrace snižovaly ve všech případech pouze mírně.

Metabolická činnost kvasinky 5 byla do 3. dne ve srovnání s ostatními kvasinkami pomalejší, z důvodu delší adaptace na podmínky prostředí moštu. Konečná koncentrace redukujících sacharidů v moštu se pohybovala v rozmezí 2,4 – 2,6 g.l⁻¹.



Graf 36: Závislost koncentrace redukujících sacharidů na čase – prostředí K⁺

V grafu 36 je znázorněn pokles koncentrace redukujících sacharidů v průběhu kvašení nezasířeného moštu K⁺ testovanými kvasinkami 1 – 5. Počáteční koncentrace redukujících sacharidů v moštu K⁺ byla 151,6 g.l⁻¹. Adaptace kvasinek na prostředí moštu byla rychlá a jejich metabolickou činností došlo k největšímu poklesu koncentrace redukujících sacharidů do 7. dne, poté se koncentrace snižovala pouze mírně a mezi 11. a 25. dnem došlo pouze k nepatrnému snížení koncentrace. V případě křivky znázorňující metabolickou činnost kvasinky 5 je možné pozorovat zpomalení snižování koncentrace již od dne 5. Konečná koncentrace se pohybovala v rozmezí 1,9 – 2,6 g.l⁻¹. V porovnání s moštem K (bez přídavku živin) jsou konečné koncentrace redukujících sacharidů nižší, což lze přisuzovat vlivu přídavku živin do média na některé z kvasinek (viz kap. 4.8).

- *Podle výsledků stanovení množství uvolněného CO₂ i stanovení redukujících sacharidů byla metabolická aktivita testovaných kvasinek nejintenzivnější mezi 3. a 11. dnem fermentace. Přídavek živin pozitivně ovlivnil průběh fermentace. Na počátku fermentace došlo v důsledku přídavku živin ke snížení doby adaptace na prostředí. Po přidání živin do moštu v průběhu fermentace došlo v následujících dnech ke zvýšení metabolické aktivity kvasinek.*

Ve většině případů byly zaznamenány vyšší hodnoty uvolněného CO₂ činností autochtonních kvasinek, než při fermentaci komerční kvasinkou. Ve 3 případech byly hodnoty uvolněného CO₂ o něco nižší než při fermentaci komerční kvasinkou a v 1 případě byly maximální hodnoty uvolněného CO₂ stejné. Počáteční koncentrace redukujících sacharidů byla 182,8 g.l⁻¹ v zasířeném moštu A (A+) a 153,8 g.l⁻¹ v nezasířeném moštu K (K+). Koncentrace na konci fermentace se pohybovala v rozmezí 2,8 – 3,0 g.l⁻¹ v moštu A, 2,8 – 3,1 g.l⁻¹ v moštu A+, 2,4 – 2,6 g.l⁻¹ v moštu K a 1,9 – 2,6 g.l⁻¹ v moštu K+. Průběh snižování koncentrace redukujících sacharidů

koresponduje s křivkami znázorňující průběh fermentace pomocí uvolněného CO₂. Koncentrace redukujících sacharidů se nejprve snižovala pomalu, z důvodu adaptace kvasinek na prostředí, poté vlivem metabolické činnosti kvasinek došlo k vysokému snížení koncentrace a v závěru fermentace došlo ke zpomalení snižování koncentrace redukujících sacharidů. Nejvyšší metabolická aktivita se projevila u kvasinky 3 v zasiřeném prostředí, do kterého byly průběžně přidávány živiny.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vybrat vhodnou autochtonní kvasinku pro výrobu vína. V teoretické části je popsána réva vinná, jako základní surovina pro výrobu vína, byl rozebrán proces výroby vína se zaměřením na kvašení moštu. V další části byly popsány kvasinky, jejich taxonomie, morfologie, metabolismus a kvasinky významné ve vinařství. V závěru teoretické části byly vysvětleny principy fyziologických testů, které se používají k popisu vlastností kvasinek a metoda PCR-RFLP, která slouží k identifikaci kvasinek. Fyziologické testy a metoda PCR- RFLP byly použity v experimentální části.

Vzorky pro experimentální část práce byly získány z bobulí révy vinné, které poskytlo vinařství Maňák Žádovice. Z bobulí bylo vyizolováno celkem 18 vzorků. Po izolaci DNA byla provedena PCR, kdy k amplifikaci byla zvolena kódující oblast 5,8S-ITS rDNA a primery ITS1, ITS4.

Amplifikací byly získány 4 skupiny fragmentů o velikostech 880 bp (4 vzorky), 650 bp (6 vzorků), 500 bp (3 vzorky), 480 bp (5 vzorků). Pro taxonomické zařazení vzorků byla provedena restriční analýza, kde byly použity restriční endonukleázy *HaeIII*, *HinfI* a *HhaI*. Na základě výsledků PCR-RFLP byly na bobulích identifikovány rody *Saccharomyces* a *Pichia*. Na úrovni druhů byly identifikovány *Pichia subpelliculosa*, *Pichia membranifaciens* a *Pichia fluxum*.

Pomocí programu BioNumerics byla provedena analýza genetické podobnosti, kdy byly vzorky rozděleny do 4 skupin, které korespondují s velikostí PCR produktů a taxonomickým zařazením.

Pro provedení fyziologických testů byly ze 4 identifikovaných vzorků *Saccharomyces cerevisie* vybrány 2 vzorky. Dále byly vybrány 2 vzorky kvasinek, které byly vyizolované v rámci diplomových prací v letech 2009-2012. Pro srovnání byla do testu zařazena jedna komerční kvasinka.

- Při testování zkvašování sacharidů bylo zjištěno, že všech 5 kvasinek zkvašuje glukózu a žádná z nich nezkvašuje laktózu. Jako kvasný typ II (*cerevisiae*), schopný kvasit sacharózu a maltózu byla na základě testu kromě komerční kvasinky označena kvasinka 5.
- Za účelem výběru nejvhodnějšího prostředí a kvasinku pro přípravu inokula byly porovnány růstové křivky kvasinek v nezasířeném a zasířeném moštu, dále v moštu s přídavkem a bez přídavku živin a v glukózových médiích. Bylo zjištěno, že:
 - Pro přípravku inokula je vhodné prostředí glukózových médií a nezasířeného moštu.
 - V případě použití zasířeného prostředí je třeba podpořit růst kvasinek přídavkem živin.
 - Přídavek živin do prostředí snižuje dobu adaptace kvasinek na podmínky prostředí.
 - Z hlediska růstu v zasířeném prostředí je nejvhodnější pro přípravu inokula autochtonní kvasinka 3.
 - Z hlediska růstu v nezasířeném prostředí jsou pro přípravu inokula vhodné všechny testované autochtonní kvasinky.

- Sledováním tolerance k vyšší koncentraci sacharidů bylo zjištěno, že všechny kvasinky jsou schopny růstu v prostředí obsahujícím až 50 % glukózy a mohou být označeny jako osmotolerantní a vhodné pro kvašení vinných moštů.
- Při sledování tolerance kvasinek k alkoholu bylo zhodnoceno, že za nejodolnější k vyšším koncentracím ethanolu lze z testovaných kvasinek považovat kvasinku 5, která byla jako jediná schopna se množit i v prostředí obsahujícím 16 % ethanolu a nepatrný nárůst byl zaznamenán i v prostředí s 18 % ethanolu.
- Jako vhodnou pro výrobu vína lze z hlediska tolerance k alkoholu považovat také kvasinku 3, která se stejně jako kvasinka 5 v prostředí s obsahem 8 a 12 % ethanolu intenzivněji množila.
- Průběh fermentace byl popsán pomocí stanovení množství uvolněného CO₂, a stanovení koncentrace redukujících sacharidů v průběhu kvašení moštů.

Bylo zjištěno, že:

- Metabolická aktivita kvasinek byla nejintenzivnější mezi 3. a 11. dnem.
- Přídavek živin do moštu na počátku fermentace snížil dobu adaptace kvasinek na prostředí.
- Přídavek živin v do moštu v průběhu fermentace zvýšil intenzitu metabolické aktivity kvasinek v následujících dnech.
- Přídavek živin neměl výrazný vliv na metabolickou aktivitu komerční kvasinky v zasířeném prostředí, a kvasinky 3 a 5 v nezasířeném prostředí.
- Činností autochtonních kvasinek došlo ve většině případů k vyššímu uvolnění CO₂, než v případě metabolické činnosti komerční kvasinky.
- Nejvyšší metabolická aktivita se projevila u kvasinky 3 v zasířeném prostředí, do kterého byly průběžně přidávány živiny.
- Průběh snižování koncentrace redukujících sacharidů koresponduje s křivkami znázorňující průběh fermentace pomocí uvolněného CO₂.

Na základě zjištěných vhodných oenologických vlastností by mohly být pro výrobu vína použity autochtonní kvasinky 3 a 5. Zařazení kvasinek do kvasného procesu předchází provedení dalších testů a fermentace ve velkých objemech moštu přímo ve vinařství. Po provedení chemické a senzorické analýzy může být definitivně rozhodnuto, zda jsou tyto kvasinky vhodné či nikoliv.

Kvasinka 5 byla poskytnuta vinařství, z jehož vinice byla kvasinka vyizolována, pro další testování (viz příloha 14).

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. FRUDÍKOVÁ, Katarína a Fedor MALÍK. Autochtónne kvasinky a ich aplikácia do vinárskej praxe. *Vinařský obzor*. 2008, č. 5.
2. VOC. VINAŘSKÝ FOND. *Vinařství VOC* [online]. 2012 [cit. 2014-04-09]. Dostupné z: <http://www.vinarstvivoc.cz/domu>
3. FLEET, G. H.: *Wine: Microbiology and Biotechnology*. 2nd ed. New York: CRC Press, 1993. 510 p. ISBN 0-415-27850-3.
4. KRAUS, Vilém. *Nová encyklopedie českého a moravského vína*. Praha: Praga Mystica, 2005-2008. ISBN 97880867670932.
5. PAVLOUŠEK, Pavel. *Pěstování révy vinné: moderní vinohradnictví*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3314-2.
6. STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství*. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Překlad Jiří Sedlo. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010. ISBN 978-80-903201-9-2.
7. FARKAŠ, Jan. *Technológia a biochémia vína*. Bratislava: ALFA, 1973.
8. PAVLOUŠEK, Pavel. *Výroba vína u malovínařů*. 2. aktualizované a rozšířené vydání. Překlad Jiří Sedlo. Praha: Gradapublishing, 2010, 120 s. ISBN 978-80-247-3487-3.
9. Víno. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2013 [cit. 2013-11-02]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006609&docType=ART&nid=11427&chnum=2>
10. VOGEL, Wolfgang. *Víno z vlastního sklepa: pro začínající i zkušené výrobce domácího vína*. Líbeznice: Víkend, 2010. ISBN 978-80-7433-026-1.
11. KRAUS, Vilém, Vítězslav HUBÁČEK a Petr ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. 3. vyd. Praha: Brázda, 2010. ISBN 978-80-209-0378-5.
12. HUBÁČEK, Vítězslav. *Výroba révového vína*. Vyd. 1. Ilustrace Otakar Procházka. Institut výchovy a vzdělávání ministerstva zemědělství České republiky, 1997, 40 s. ISBN 80-710-5140-3.
13. KRAUS Vilém a Antonín KONEČNÝ. *Základy výroby vína*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1958.
14. Vinařství - Druhy lisů. *AF MENDELU* [online]. 2013 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1195
15. FARKAŠ, Jan. *Technologie a biochemie vína: Druhé, přepracované a doplněné vydání*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1980.
16. Víno: Zvyšování cukernatosti. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2013 [cit. 2014-03-14]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?nid=11427&docid=1006609&chnum=8>
17. MORENO-ARRIBAS, M a M POLO. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, 735 p. ISBN 9780387741185.
18. HAVKIN-FRENKEL, D a Faith C BELANGER. *Biotechnology in flavor production*. Ames, Iowa: Blackwell, 2008. ISBN 14-051-5649-X.

19. VIN, Organisation internationale de la vigne et du. Code international des pratiques oenologiques: incluses, [les] résolutions adoptées à Izmir (Turquie), 10ème AG, 22 juin 2012. Éd. 2013. Paris: OIV. ISBN 979-109-1799-041.
20. MARO, Elena Di, Danilo ERCOLINI a Salvatore COPPOLA. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 117, issue 2. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.00>
21. ESTEVE-ZARZOSO, B, A GOSTÍN CAR, R BOBET, F URUBURU, A QUEROL, M. Teresa FERNÁNDEZ-ESPINAR, Silvia LLOPIS, Amparo QUEROL, Eladio BARRIO Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penedès' area (Spain). *Food Microbiology*. 2000, vol. 17, issue 5, s. 235-241. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-7598-6_22.
22. V., Švejcár. Kvasinky, teplota a kvašení. *Vinařský obzor*. 2013, č. 2.
23. LIANG, Heng-Yu, Jing-Yu CHEN, Malcolm REEVES a Bei-Zhong HAN. Aromatic and sensorial profiles of young Cabernet Sauvignon wines fermented by different Chinese autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Research International*. 2013, vol. 51, issue 2, s. 855-865.
24. ORTIZ, Maria Jesus, Nuria BARRAJÓN a Milla Alves BAFFI. Spontaneous must fermentation: identification and biotechnological properties of wine yeasts. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, č. 50, s. 371-377.
25. PELIKÁN, Miloš, František DUDÁŠ a Drahomír MÍŠA. *Technologie kvasného průmyslu*. 2. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2002c1996. ISBN 80-715-7578-X.
26. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
27. MINÁRIK, Erich a Anton NAVARA. *Chémia a mikrobiológia vína*. Bratislava: Príroda, 1986.
28. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1982.
29. Jadro. *Biopedia* [online]. 2014 [cit. 2014-03-28]. Dostupné z: <http://www.biopedia.sk/?cat=bunka&file=jadro>
30. VOET Donald., VOETOVÁ Judith G. *Biochemie*. 1. české vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995, 1325 s. ISBN 80-85605-44-9.
31. HAMPL, Bohuš. *Mikrobiologie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1964.
32. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990, 699 s. ISBN 80-050-0644-6.
33. JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 8. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2006. ISBN 80-718-2217-5.
34. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky*. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatury, 1957.

35. Vinařství – Kinetika růstu kvasinek. *AF MENDELU* [online]. 2013 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z:
http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1252
36. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Kvasinky*. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo technickej literatury, 1957.
37. Rainieri S., Zambonelli C., Kaneko Y.: *Saccharomyces sensu stricto: Systematics, genetics diversity and evolution*. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 2003, 1–9.
38. WHITE, John. *Yeast Technology*. London: Champan and Hall, 1954.
39. Matoulková, D. – Šavel, J.: Brewing and the taxonomy of brewer's yeast. *Kvasny Prum.* 53, 2007, No. 7–8, pp. 206–214.
40. PETERSEN, R. F., T. NILSSON-TILGREN a J. PISKUR. Karyotypes of *Saccharomyces sensu lato* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1999, vol. 49, issue 4, s. 1925-1931. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-49-4-1925>.
41. MASNEUF-POMARÈDE, I., C. Le JEUNE, P. DURRENS, . Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers. *Systematic and Applied Microbiology*. 2007, vol. 30, issue 1. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-5491-1_14
42. KUTTELVAŠER, Zdeněk. *Abeceda vína*. Vyd. 2. Praha: Radix, 2003. ISBN 80-860-3143-8.
43. MINÁRIK, Erich. Príčiny, pôvodcovia a prevencia birzovatenia hroznových vín. *Kvasný priemysl*. 1981, č. 6.
44. FRUDÍKOVÁ, Katarína a Fedor MALÍK. Kvasinky vo vinárstve. *Vinařský obzor*. 2007, č. 10, s. 488-490.
45. BURDYCHOVÁ, Radka a Pavla SLÁDKOVÁ. *Mikrobiologická analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-116-6.
46. ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Praha: Academia, 1986.
47. BURDYCHOVÁ, Radka a Pavla SLÁDKOVÁ. *Mikrobiologická analýza potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 208 s., ISBN 978-80-7375-116-6.
48. ŠMARDA, Jan a Jiří DOŠKAŘ. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
49. WALKER, J. M; RAPPLEY, R.: *Molecular Biology and Biotechnology*. 4th ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006. 563 p. ISBN 0-85404-606-2.
50. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
51. FERNÁNDEZ, M. T, J. F. UBEDA a A. I. BRIONES. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, vol. 173, issue 1, s. 223-229. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13506>.

52. PRŮŠA, R.; LÁNY, J.; VEJVALKA, J.; KARGER, V.; KOTAŠKA, K: *Multimediální učebnice DNA diagnostiky*. 1. vydání. Praha: 2. lékařská fakulta UK, 1998. Dostupné z WWW: <<http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-DNA/>>.
53. RUMML, T. *Genové inženýrství*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická, 2002. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
54. LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU, Yong Hoon KIM, Seow VEN a RANI. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, issue 62. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/36891>.
55. Products. *TaKaRa* [online]. 2014 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://www.clontech.com/takara/NL/Products>
56. VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
57. VILLA-CARVAJAL, Mercedes, Amparo QUEROL a Carmela BELLOCH. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8S ribosomal DNA gene. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006, vol. 90, issue 2, s. 171-181. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-006-9071-0>.
58. *VĚSTNÍK ÚSTŘEDNÍHO KONTROLNÍHO A ZKUŠEBNÍHO ÚSTAVU ZEMĚDĚLSKÉHO*. Ročník XII, Řada: Národní odrůdový úřad, Číslo: S, Červen 2013.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

VOC	víno originální certifikace
°NM	normalizovaný moštoměr
ASVK	aktivní suchá vinná kvasinka
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
CDC	označení genu, z angl. cell division cycle
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (redukováná forma)
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
S.	<i>Saccharomyces</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
dATP	deoxyadenosintrifosfát
dCTP	deoxycytosintrifosfát
dTTP	deoxythimintrifosfát
dGTP	deoxyguanintrifosfát
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
dsRNA	dvouřetězcová RNA
rRNA	ribosomální RNA
rDNA	ribosomální DNA
ITS	vnitřní přepisová oblast (z angl. internal transcribed spacer)
A	adenin
T	thimin
C	cytosin
G	guanin
Bp	počet páru bází
°ČSN	český normalizovaný moštoměr
ETDA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
<i>Taq</i>	termostabilní DNA polymeráza
POV	pracovní označení vzorku
VA	velikost amplikonu
P	pozitivní kontrola
N	negativní kontrola
S1	délkový standard 20 bp
S2	délkový standard 100 bp
VRF	velikost restrikčního fragmentu
n	neštěpeno
A	zasířený mošt
A+	zasířený mošt s přídavkem živin
K	nezasířený mošt
K+	nezasířený mošt s přídavkem živin

G	glukózové médium
G+	glukózové médium s přidavkem živin
GN	glukózové médium 2
O+	médium obsahující 50 % glukózy
O-	médium obsahující 10 % glukózy

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Seznam odrůd révy vinné

Příloha 2: Přepočítání stupňů normalizovaného moštoměru na přirozený obsah alkoholu v % obj.

Příloha 3: Maximální limity pro zvyšování obsahu alkoholu

Příloha 4: Elektroforegramy PCR produktů a restrikčních fragmentů

Příloha 5: Naměřené hodnoty růstu kvasinek

Příloha 6: Výsledky počítání živých buněk

Příloha 7: Růstové křivky kvasinek

Příloha 8: Naměřené hodnoty při sledování osmotolerance

Příloha 9: Naměřené hodnoty při sledování tolerance k alkoholu

Příloha 10: Naměřené hodnoty v průběhu sledování fermentace

Příloha 11: Výsledky sledování průběhu fermentace

Příloha 12: Grafické znázornění hmotnosti médií v průběhu fermentace

Příloha 13: Naměřené hodnoty a výsledky stanovení redukujících sacharidů

Příloha 14: Fotografie z testování kvasinky ve vinařství

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Seznam odrůd révy vinné

Tabulka 1: Seznam odrůd révy vinné zapsaných ve Státní odrůdové knize ke dni 15. Června 2013 [58]

Název odrůdy	Rok zápisu	Název odrůdy	Rok zápisu
odrůdy moštové		Rinot	2008
Acolon	2011	Rubinet	2005
Agni	2001	Rulandské bílé	1941
Alibernet	1975	Rulandské modré	1941
André	1980	Rulandské šedé	1941
Ariana	2001	Ryzlink rýnský	1941
Aurelius	1983	Ryzlink vlašský	1941
Auxerrois	2004	Sauvignon	1952
Blauburger	2011	Savilon	2010
Cabernet Dorsa	2011	Sevar	2008
Cabernet Moravia	2001	Svatovavřínecké	1941
Cabernet Sauvignon	1980	Sylvánské zelené	1941
Cerason	2008	Tramín červený	1941
Děvín	1998	Veltlínské červené rané	1952
Domina	2004	Veltlínské zelené	1941
Dornfelder	2004	Veritas	2001
Erilon	2011	Vesna	2012
Florianka	2010	Vrboska	2004
Frankovka	1941	Zweigeltrebe	1980
Fratava	2008	odrůdy stolní	
Hibernal	2004	Arkadia	2001
Chardonnay	1987	Diamant	1998
Irsai Oliver	1972	Chrupka bílá	1941
Jakubské	2011	Chrupka červená	1941
Kerner	2001	Julskiviser	1972
Kofranka	2011	Olšava	1988
Laurot	2004	PanoniaKincse	1980
Lena	2001	Pola	2001
Malverin	2001	Vitra	1993
Merlot	2001	podnož	
Modrý portugal	1941	Amos	1990
Muškat moravský	1987	Berlandieri x Riparia 125 AA	1979
Muškat Ottonel	1952	Berlandieri x Riparia Craciunel	1979
Müller Thurgau	1941	Berlandieri x Riparia Kober 5BB	1979
Nativa	2010	Berlandieri x Riparia SO-4	1979
Neronet	1991	Berlandieri x RipariaTeleki 5C	1979
Neuburské	1941	LE-K/1	1979
Pálava	1977		

Příloha 2: Přepočítání stupňů normalizovaného moštoměru na přirozený obsah alkoholu v % obj.

Tabulka 2: Přepočítání stupňů normalizovaného moštoměru na přirozený obsah alkoholu v % obj. Příloha k zákonu č. 321/2004 Sb.[8]

°NM	% obj.	°NM	% obj.	°NM	% obj.
0,8	0,5	15,1	9	36,1	21,5
1	0,6	16	9,5	37	22
1,7	1	16,8	10	37,8	22,5
2	1,2	17	10,1	38	22,6
2,5	1,5	17,6	10,5	38,6	23
3	1,8	18	10,7	39	23,2
3,4	2	18,5	11	39,5	23,5
4	2,4	19	11,3	40	23,8
4,3	2,5	19,3	11,5	40,3	24
5	3	20	11,9	41	24,4
5,9	3,5	20,2	12	41,2	24,5
6	3,6	21	12,5	42	25
6,7	4	21,8	13	42,8	25,5
7	4,2	22	13,1	43	25,6
7,6	4,5	22,7	13,5	43,7	26
8	4,8	23	13,7	44	26,2
8,4	5	23,5	14	44,5	26,5
9	5,4	24	14,3	45	26,8
9,2	5,5	24,4	14,5	45,4	27
10	6	25	14,9	46	27,4
11	6,5	25,2	15	46,2	27,5
11,8	7	26	15,5	47	28
12	7,1	26,9	16	47,9	28,5
12,6	7,5	27	16,1	48	28,6
13	7,7	33,6	20	48,7	29
13,4	8	36	20,2	49	29,2
14	8,3	34,4	20,5	49,6	29,5
14,3	8,5	35	20,8	50	29,8
15	8,9	35,3	21		

Příloha 3: Maximální limity pro zvyšování obsahu alkoholu

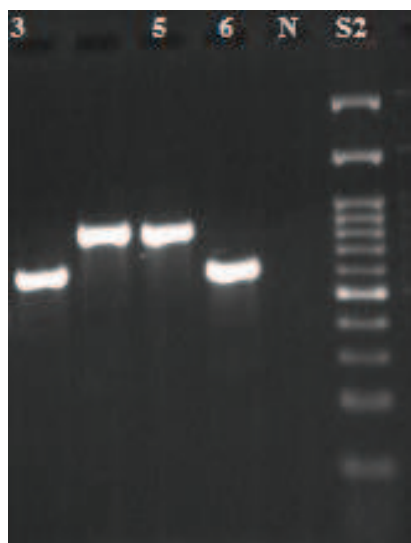
Tabulka 3: Maximální limity pro zvyšování přirozeného alkoholu platné od roku 2011[16]

ČECHY			
	stolní a zemská vína		jakostní odrůdová a známková vína
	bílé a růžové	červené	bílé, růžové i červené
max. alkohol ve víně (% obj.)	11,5	12,0	15,0
max. cukernatost upraveného moštu (°NM)	19,3	20,2	25,2
MORAVA			
	stolní a zemská vína		jakostní odrůdová a známková vína
	bílé a růžové	červené	bílé, růžové i červené
max. alkohol ve víně (% obj.)	12,0	12,5	15,0
max. cukernatost upraveného moštu (°NM)	20,2	21,0	25,2

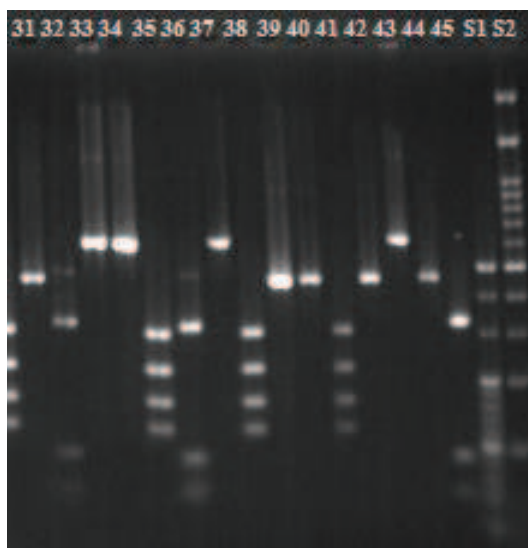
Ve vinařské oblasti Čechy lze zvyšovat přirozený obsah alkoholu maximálně o 3 % obj. což odpovídá navýšení cukernatosti moštů a rmutů maximálně o 5 °NM.

Ve vinařské oblasti Morava lze zvyšovat přirozený obsah alkoholu maximálně o 2 % obj. což odpovídá navýšení cukernatosti moštů a rmutů maximálně o 3,4 °NM [16].

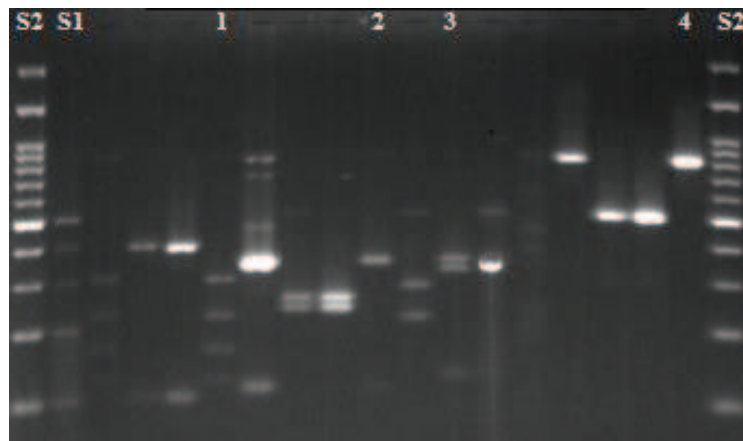
Příloha 4: Elektroforegramy PCR produktů a restrikčních fragmentů



Obrázek 1: Elektroforegram PCR produktů získaných amplifikací primery ITS1 a ITS4
(N – negativní kontrola, S2 – délkový standard 100 bp, 3, 5, 6 – PCR produkty)



Obrázek 2: Elektroforeogram restrikčních fragmentů získaný štěpením PCR produktů pomocí restrikční endonukleázy HaeIII,
(S2 – délkový standard 100 bp, S1 – délkový standard 20 bp, P – pozitivní kontrola, 31 – 45 – štěpené PCR produkty)



Obrázek 3: Elektroforegram PCR produktů a restrikčních fragmentů komerční kvasinky (S2 – délkový standard 100 bp, S1 – délkový standard 20 bp, 1 – PCR produkt štěpený enzymem HaeIII, 2 – PCR produkt štěpený enzymem HinfI, 3 – PCR produkt štěpený enzymem HhaI, 4 – PCR produkty)

Příloha 5: Naměřené hodnoty růstu kvasinek

Tabulka 4: Naměřené hodnoty optické hustoty v průběhu sledování růstu kvasinek

	1 [h]	3 [h]	6 [h]	9 [h]	12 [h]	24 [h]	2 [den]	3 [den]	4 [den]	5 [den]	6 [den]	7 [den]	8 [den]	9 [den]	10 [den]	11 [den]	12 [den]	13 [den]	14 [den]	15 [den]	
A1	0,22	0,24	0,26	0,27	0,58	5,97	11,57	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	-	-	-	
A2	0,17	0,19	0,22	0,25	0,27	0,28	0,29	0,29	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	-	-	-	-	-	
A3	0,22	0,27	0,32	0,36	0,36	0,42	10,57	12,17	12,17	12,17	12,17	12,17	12,17	12,17	12,17	12,17	-	-	-	-	
A4	0,08	0,09	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,11	0,11	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	-	-	-	-	-	
A5	0,22	0,22	0,25	0,27	0,31	0,32	0,32	0,32	0,32	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	0,41	-	-	-	-	-	
A1+	0,25	0,25	0,27	0,42	1,36	8,29	11,57	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	12,97	-	-	-	
A2+	0,10	0,12	0,14	0,14	0,22	0,22	0,22	0,27	0,29	0,29	1,82	10,47	12,37	12,37	12,37	13,37	13,37	13,37	13,37	-	
A3+	0,08	0,12	0,14	0,14	0,28	0,33	9,01	11,17	11,17	11,77	11,77	11,77	11,77	11,77	11,77	-	-	-	-	-	
A4+	0,09	0,17	0,19	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	-	-	-	-	-	
A5+	0,18	0,18	0,19	0,21	0,27	0,37	0,41	0,49	0,52	9,97	13,37	13,37	13,37	13,37	13,87	13,87	13,87	13,87	-	-	
K1	0,18	0,29	0,45	2,13	3,14	8,34	10,75	11,95	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	-	-	-	
K2	0,30	0,38	0,52	0,45	2,58	8,89	11,55	12,65	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	-	-
K3	0,13	0,16	0,42	1,02	2,37	6,69	9,55	10,65	11,35	11,75	11,75	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35
K4	0,03	0,05	0,20	0,30	2,22	9,51	12,35	12,35	12,95	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	-
K5	0,09	0,10	0,35	1,52	3,00	6,17	8,65	11,05	11,35	11,95	11,95	11,95	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	-
K1+	0,06	0,19	0,41	2,75	4,33	6,50	11,55	12,15	12,15	12,15	12,15	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	-	-
K2+	0,04	0,12	0,29	0,33	2,05	8,25	11,05	11,95	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	12,35	-	-	-	-	
K3+	0,06	0,74	0,77	1,35	3,41	6,05	8,75	9,45	10,45	10,45	11,05	11,05	11,05	11,05	11,05	11,05	11,05	11,05	11,05	11,05	-
K4+	0,16	0,21	0,31	0,35	2,90	7,52	11,55	12,35	12,65	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	13,35	-	-	-	
K5+	0,13	0,17	0,29	0,55	2,75	7,65	9,75	10,85	11,35	11,35	11,15	11,15	11,35	11,35	11,35	11,35	11,35	11,35	11,35	-	-

Tabulka 4: pokračování

	1 [h]	3 [h]	6 [h]	9 [h]	12 [h]	24 [h]	2 [den]	3 [den]	4 [den]	5 [den]	6 [den]	7 [den]	8 [den]	9 [den]	10 [den]	11 [den]	12 [den]	13 [den]	14 [den]	15 [den]
G1	0,56	0,56	0,56	2,33	4,35	5,60	8,60	9,50	9,57	10,60	10,60	10,60	-	-	-	-	-	-	-	-
G2	0,49	0,52	1,20	2,75	4,77	6,13	9,10	9,78	10,10	10,10	10,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	0,35	0,45	2,10	3,22	5,43	6,61	10,10	10,90	11,60	11,60	11,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4	0,27	0,31	0,86	3,94	4,18	5,50	7,40	9,47	9,86	9,86	9,86	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5	0,35	0,51	1,32	2,79	4,86	8,68	9,80	10,70	11,70	11,70	11,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G1+	0,50	0,74	2,17	2,25	5,30	6,22	6,30	6,45	6,50	6,50	6,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2+	0,43	0,46	0,98	1,20	5,03	8,00	9,30	10,50	11,30	11,30	11,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3+	0,35	0,50	1,20	1,52	4,31	7,53	8,44	9,33	10,00	10,00	10,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4+	0,32	0,54	0,94	1,70	4,84	9,41	9,60	9,76	10,40	10,40	10,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5+	0,35	0,36	1,62	2,27	4,57	7,75	9,80	10,30	10,80	10,80	10,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GN1	0,26	0,26	1,12	3,33	5,77	10,90	11,40	12,10	13,50	13,50	13,50	13,50	-	-	-	-	-	-	-	-
GN2	0,32	0,35	0,54	1,37	3,33	9,86	10,40	11,00	11,30	11,70	12,70	12,70	12,70	-	-	-	-	-	-	-
GN3	0,40	0,50	1,39	3,25	6,04	10,70	11,20	11,90	13,20	13,20	13,20	13,20	13,20	-	-	-	-	-	-	-
GN4	0,40	0,54	0,74	2,15	4,47	9,50	10,30	11,00	11,20	11,70	11,70	11,70	11,70	-	-	-	-	-	-	-
GN5	0,43	0,43	0,93	2,47	4,67	10,70	10,90	11,60	11,90	13,50	13,50	13,50	-	-	-	-	-	-	-	-

Příloha 6: Výsledky počítání živých buněk

Tabulka 5: Vypočítané hodnoty logaritmu živých buněk

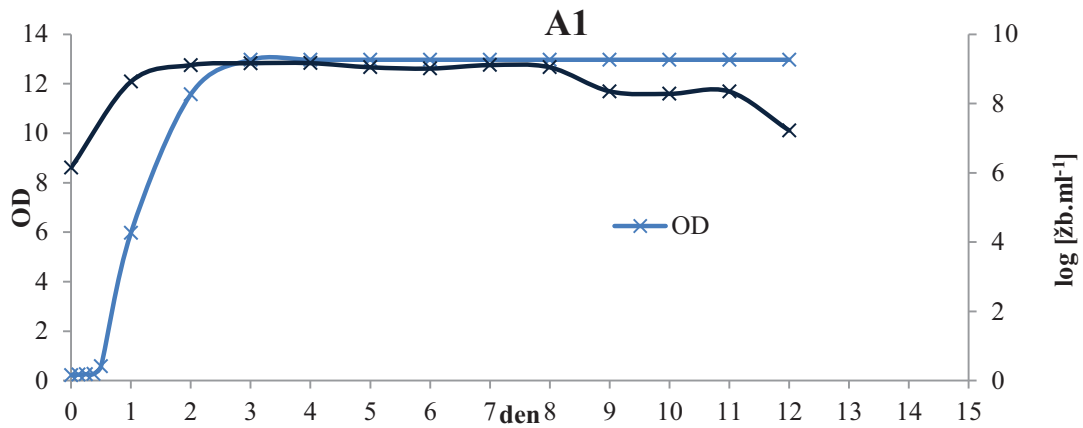
	0 [den]	1 [den]	2 [den]	3 [den]	4 [den]	5 [den]	6 [den]	7 [den]	8 [den]	9 [den]	10 [den]	11 [den]	12 [den]	13 [den]	14 [den]	15 [den]
A1	6,15	8,63	9,11	9,16	9,17	9,05	9,01	9,11	9,05	8,35	8,28	8,35	7,22	-	-	-
A2	6,18	6,21	6,19	6,24	6,43	6,21	6,19	6,02	5,85	5,24	-	-	-	-	-	-
A3	6,32	7,11	8,19	9,09	9,05	9,07	9,05	9,07	9,01	8,45	8,10	8,02	-	-	-	-
A4	6,07	6,08	6,03	6,03	6,03	6,05	6,12	6,16	5,59	4,80	-	-	-	-	-	-
A5	6,27	6,29	6,19	6,23	6,21	6,22	6,15	6,03	5,67	4,67	-	-	-	-	-	-
A1+	6,33	8,23	8,38	8,43	8,52	8,48	8,41	8,47	8,23	8,20	8,29	7,93	7,49	-	-	-
A2+	6,10	6,15	6,15	6,21	6,19	6,17	7,32	8,18	8,23	8,25	8,20	8,95	8,88	8,10	8,00	-
A3+	6,02	6,08	6,90	8,65	9,15	9,19	9,11	8,88	8,40	8,17	6,97	-	-	-	-	-
A4+	6,10	6,11	6,10	6,05	6,07	6,12	6,07	5,89	5,80	5,47	-	-	-	-	-	-
A5+	6,18	6,18	6,41	6,48	6,56	7,31	8,43	8,27	8,24	8,24	8,85	8,37	8,03	6,22	-	-
K1	6,05	8,08	8,20	8,73	8,95	8,96	8,94	8,95	9,03	8,90	8,82	8,20	7,34	-	-	-
K2	6,53	8,02	8,56	8,95	9,01	9,05	9,06	9,12	9,01	8,97	8,87	8,75	8,38	8,07	-	-
K3	6,43	7,47	7,62	8,49	8,65	8,73	8,79	8,93	8,99	8,90	8,92	8,90	8,62	8,58	8,56	7,95
K4	6,34	8,11	8,53	8,49	9,05	9,09	9,08	8,99	8,73	8,73	8,86	8,82	8,69	8,12	6,49	-
K5	6,41	7,27	7,97	8,22	8,60	8,73	8,99	9,01	9,06	9,08	8,97	8,97	8,82	8,62	7,82	-
K1+	6,39	7,73	8,21	8,88	8,88	8,82	8,88	8,95	9,01	9,03	8,70	8,20	8,20	7,62	-	-
K2+	6,36	7,73	8,06	9,01	9,06	9,06	9,05	8,73	8,69	8,55	8,05	8,01	-	-	-	-
K3+	6,38	6,75	7,22	8,27	8,65	8,61	8,66	8,70	8,65	8,62	8,69	8,41	8,29	7,82	7,05	-
K4+	6,41	7,37	8,27	8,37	8,73	9,15	9,12	9,15	9,09	8,95	8,87	8,82	8,25	-	-	-
K5+	6,39	8,08	8,29	8,40	8,95	8,90	8,99	8,99	8,99	8,99	8,85	8,35	7,90	7,22	-	-

Tabulka 5: Pokračování

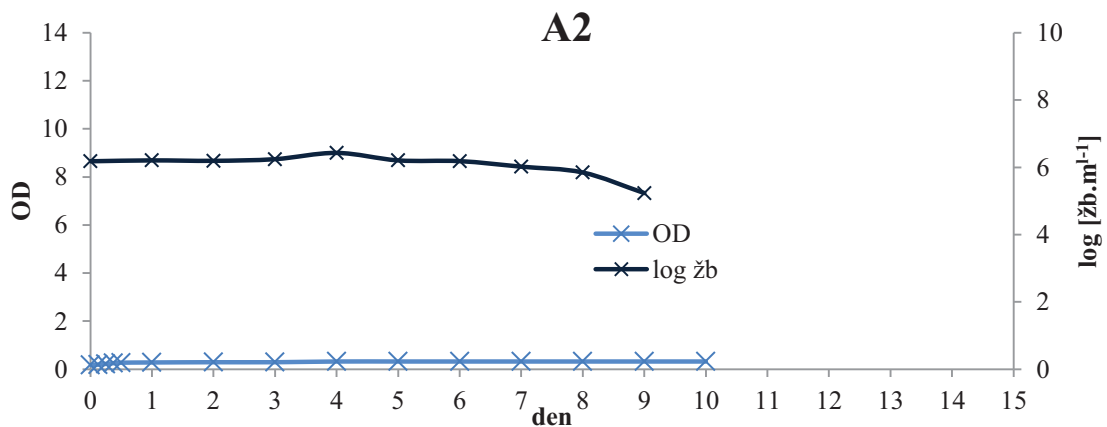
	0 [den]	1 [den]	2 [den]	3 [den]	4 [den]	5 [den]	6 [den]	7 [den]	8 [den]	9 [den]	10 [den]	11 [den]	12 [den]	13 [den]	14 [den]	15 [den]
G1	6,53	7,03	7,41	7,90	8,01	8,01	7,74	7,65	-	-	-	-	-	-	-	-
G2	6,47	7,18	7,46	7,71	7,76	7,48	6,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	6,07	7,40	8,00	8,08	8,11	7,82	6,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4	5,99	7,03	7,18	7,85	8,15	7,85	7,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5	6,32	7,41	7,94	8,79	8,82	8,85	6,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G1+	6,44	7,14	7,20	7,60	7,73	7,47	6,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2+	6,33	7,28	8,13	8,30	8,43	7,90	6,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3+	6,26	7,12	7,30	7,67	8,06	7,89	7,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4+	6,29	7,28	7,34	7,73	8,11	7,73	6,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5+	6,38	6,49	7,38	7,95	8,44	8,12	7,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GN1	6,44	7,43	8,17	8,54	8,76	8,67	8,34	7,70	-	-	-	-	-	-	-	-
GN2	6,35	7,40	8,14	8,20	8,33	8,67	8,95	8,32	6,92	-	-	-	-	-	-	-
GN3	6,38	7,60	7,83	7,88	8,35	8,37	8,36	8,25	7,22	-	-	-	-	-	-	-
GN4	6,37	7,44	7,73	7,76	7,85	8,38	8,20	7,83	7,65	-	-	-	-	-	-	-
GN5	6,40	7,59	7,82	8,05	8,28	8,82	8,48	7,27	-	-	-	-	-	-	-	-

Příloha 7: Růstové křivky kvasinek

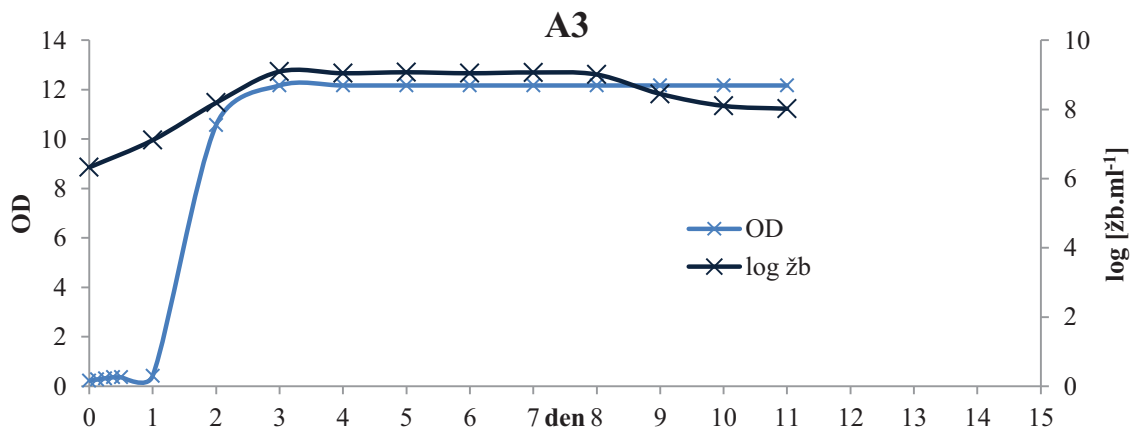
Růstové křivky kvasinek 1 – 5 v prostředí A



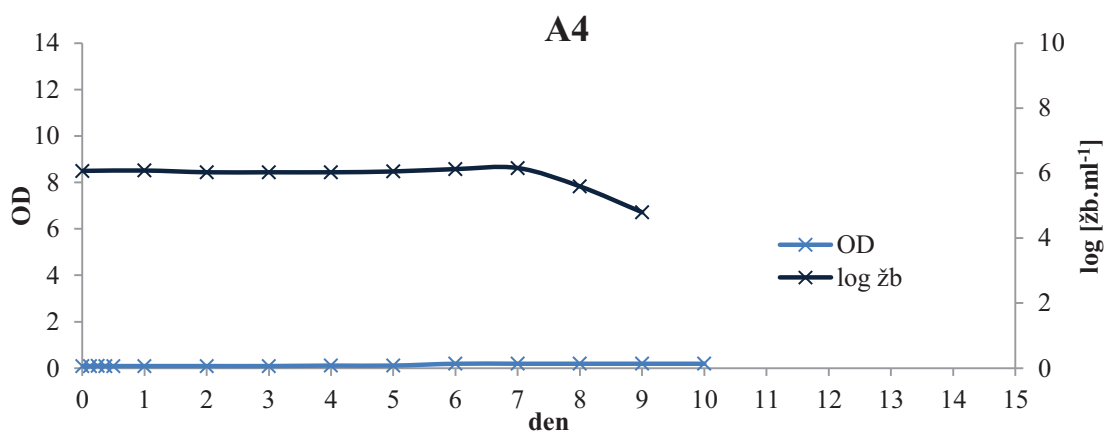
Graf 1: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 1, prostředí A)



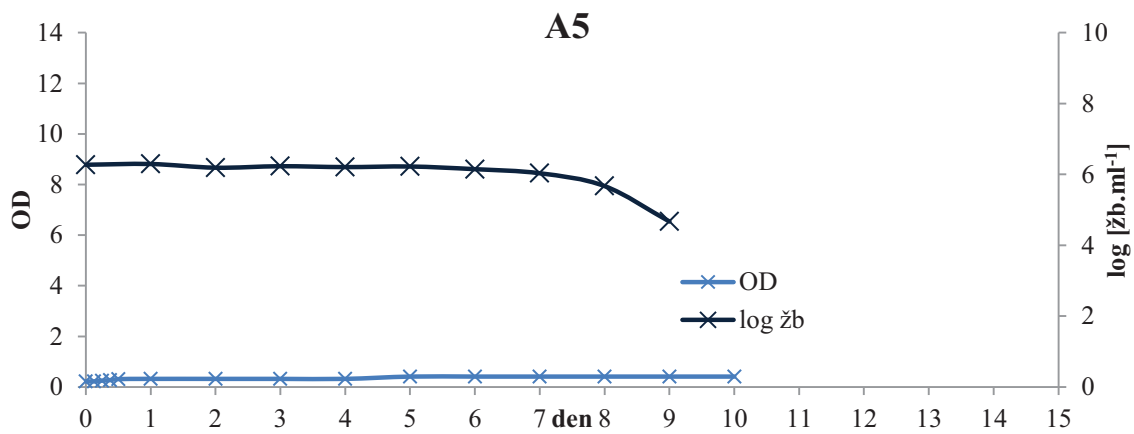
Graf 2: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 2, prostředí A)



Graf 3: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 3, prostředí A)

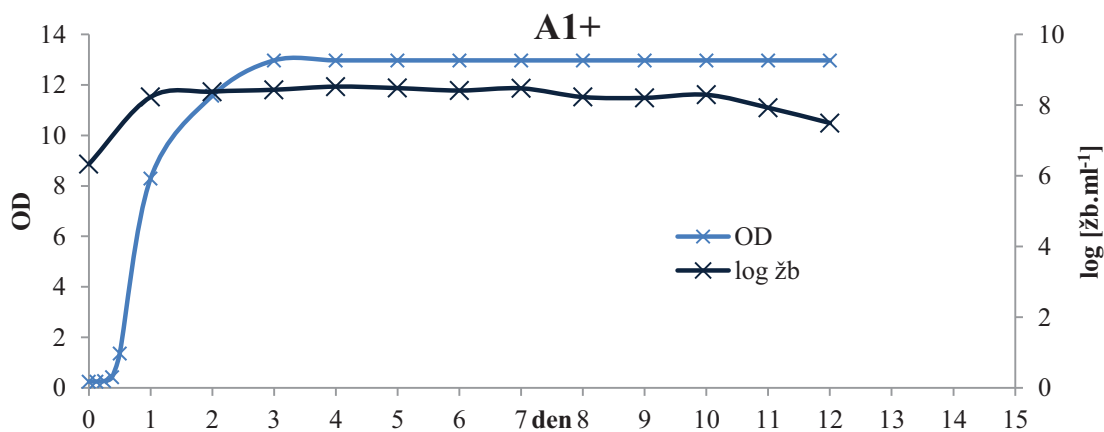


Graf 4: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase
(kvasinka 4, prostředí A)

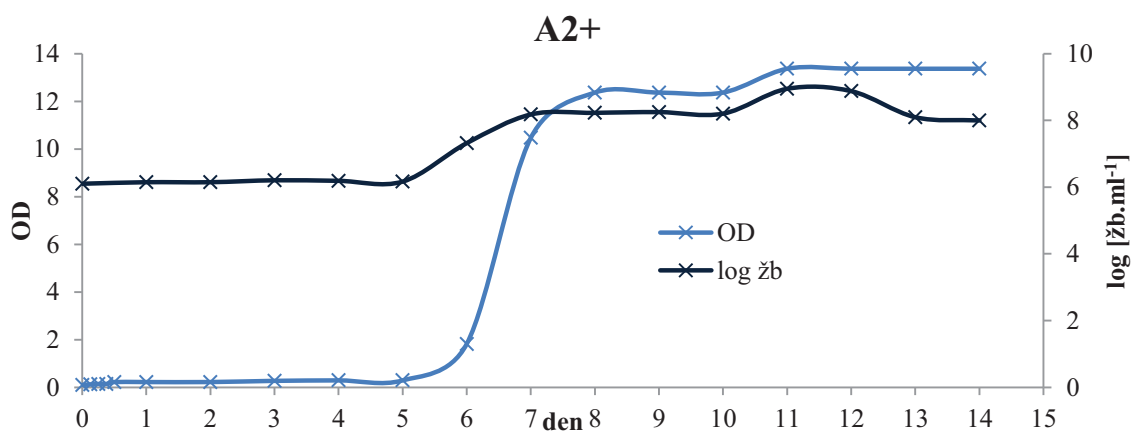


Graf 5: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase
(kvasinka 1, prostředí A)

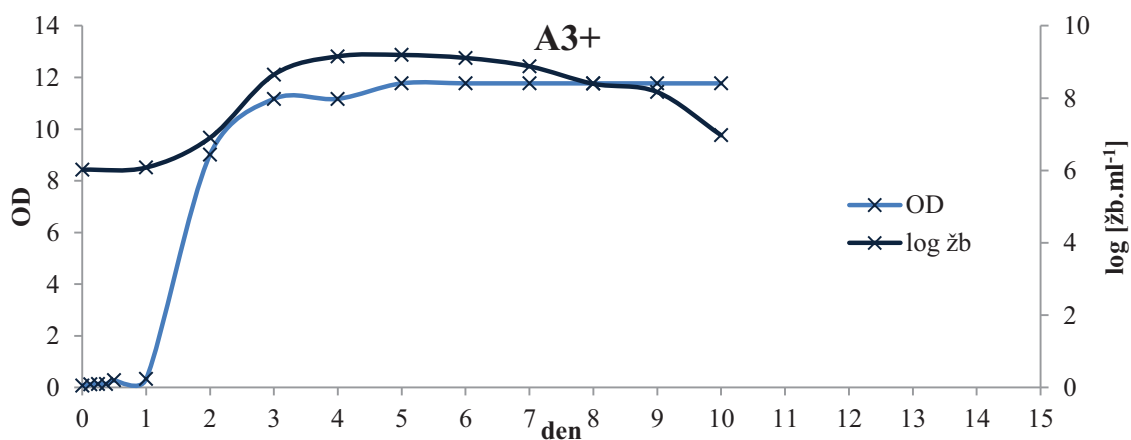
Růstové křivky kvasinek 1 – 5 v prostředí A+



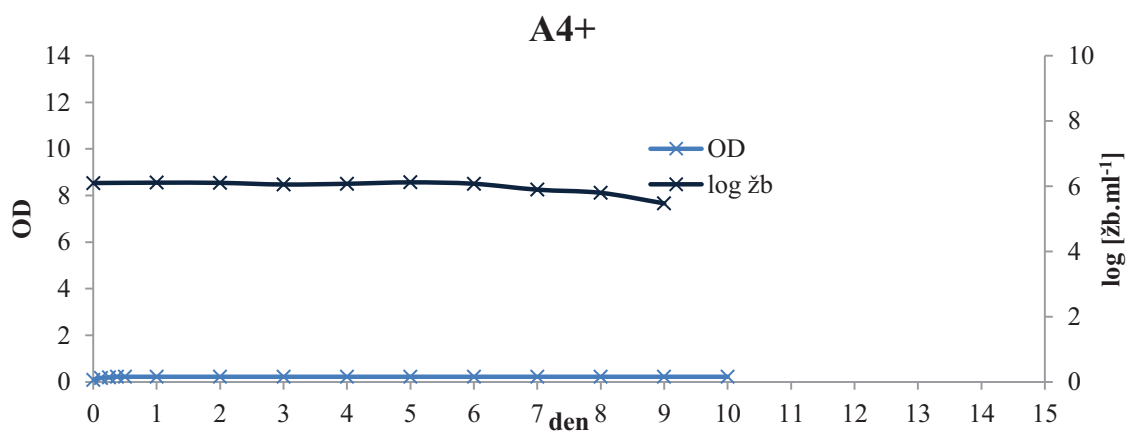
Graf 6: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 1, prostředí A+)



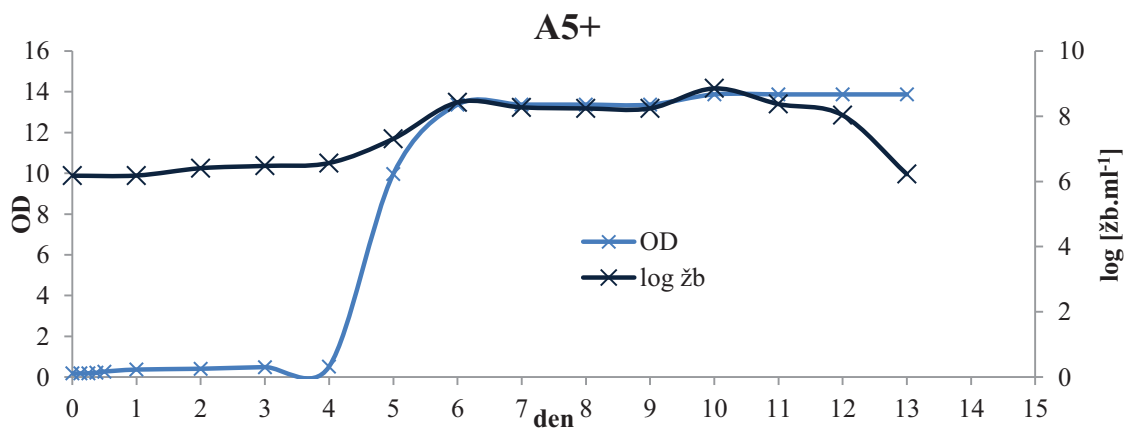
Graf 7: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 2, prostředí A+)



Graf 8: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 3, prostředí A+)

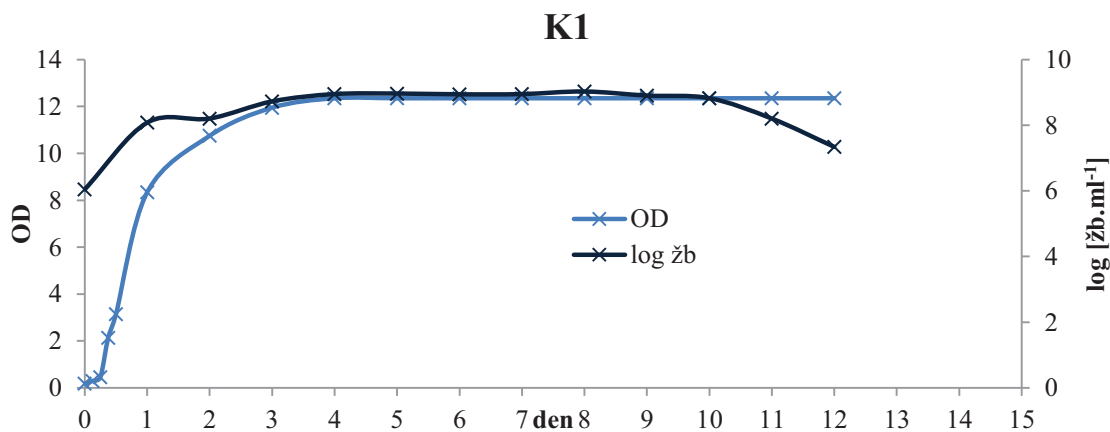


Graf 9: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 4, prostředí A+)

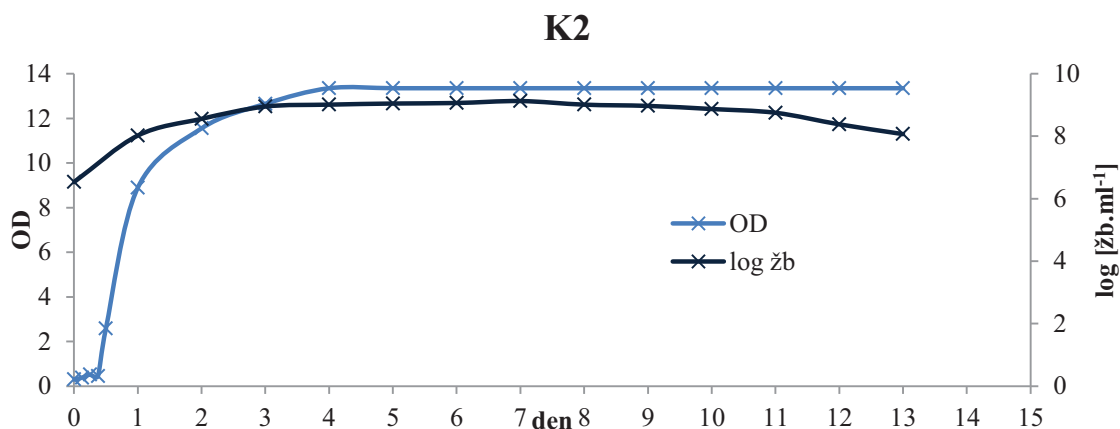


Graf 10: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 5, prostředí A+)

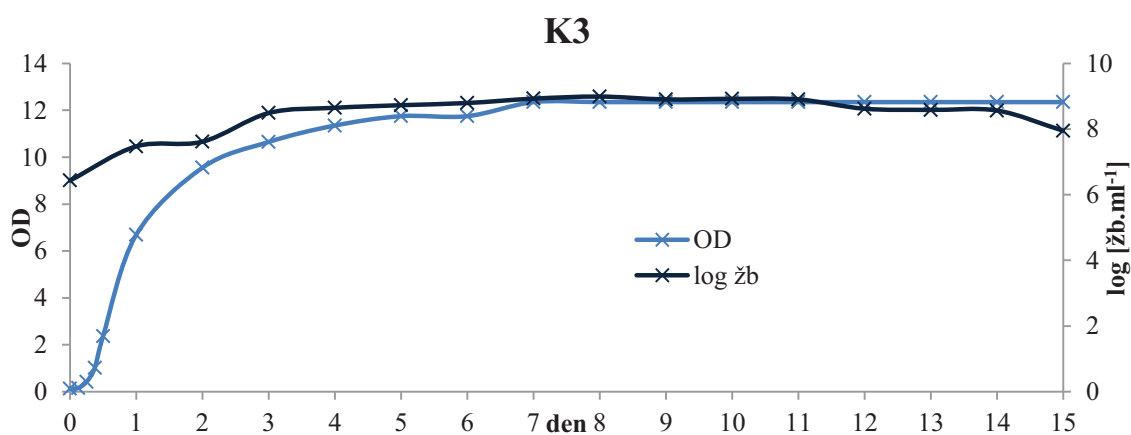
Růstové křivky kvasinek 1 – 5 v prostředí K



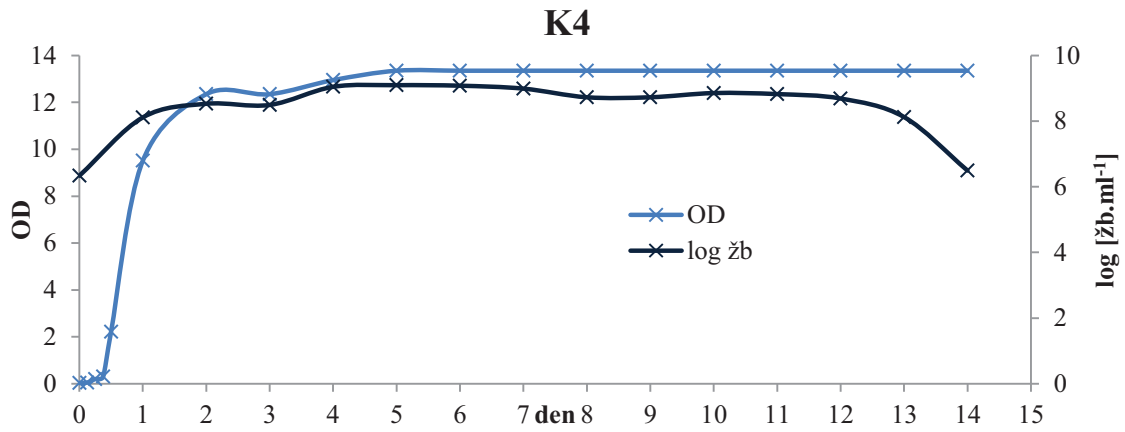
Graf 11: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 1, prostředí K)



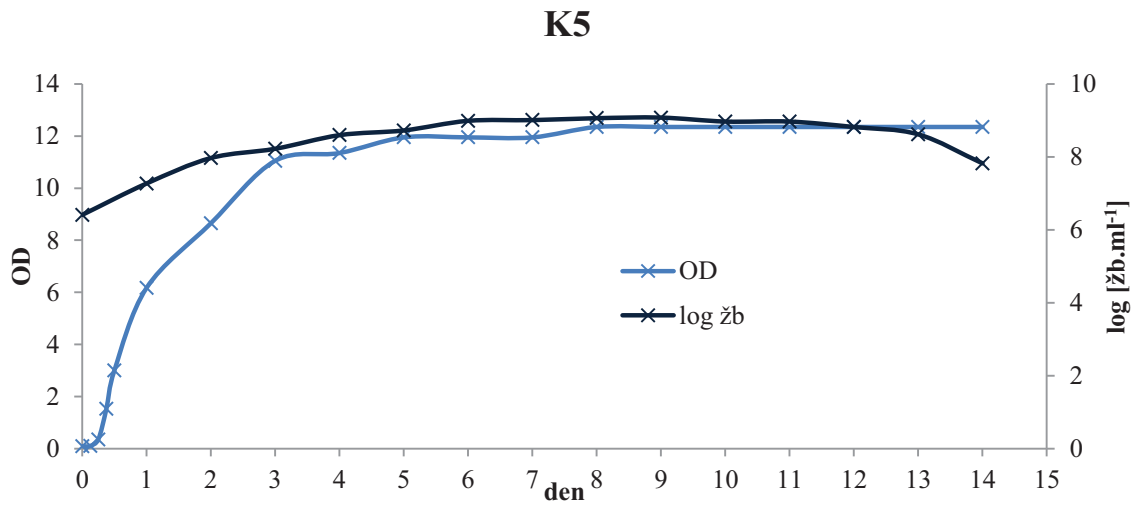
Graf 12: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 2, prostředí K)



Graf 13: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 3, prostředí K)

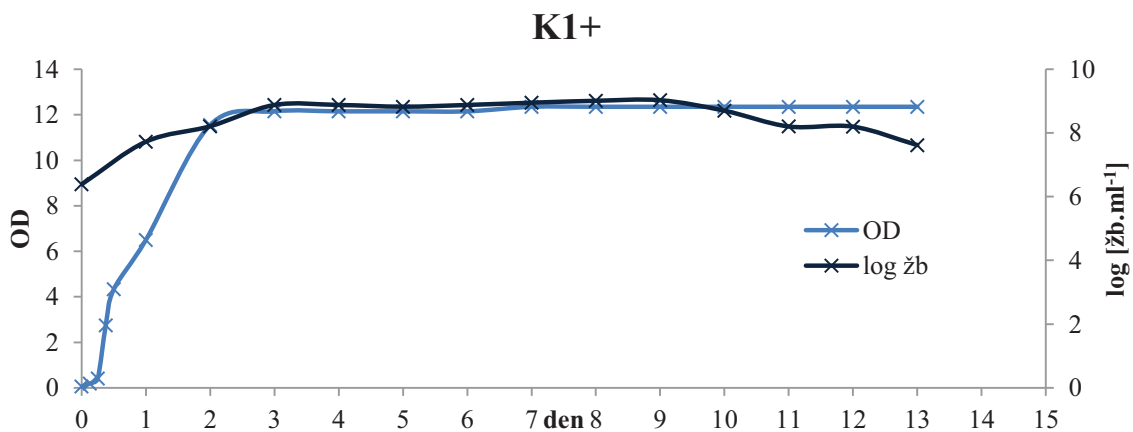


Graf 14: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 4, prostředí K)

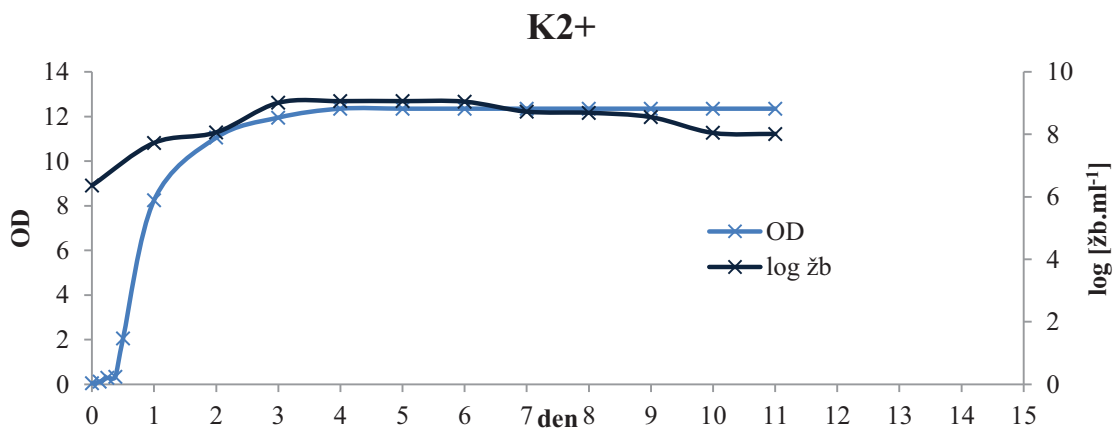


Graf 15: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 5, prostředí K)

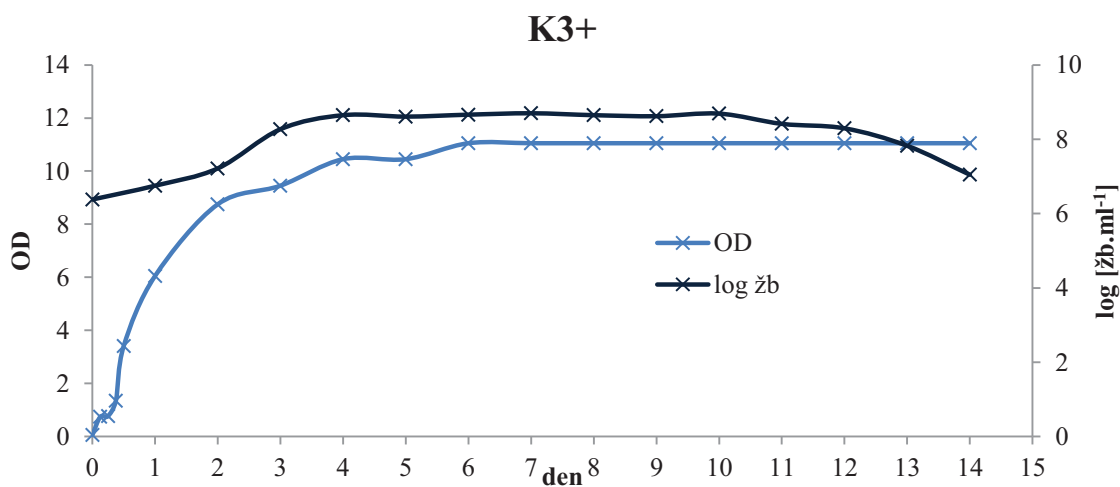
Růstové křivky kvasinek 1 – 5 v prostředí K+



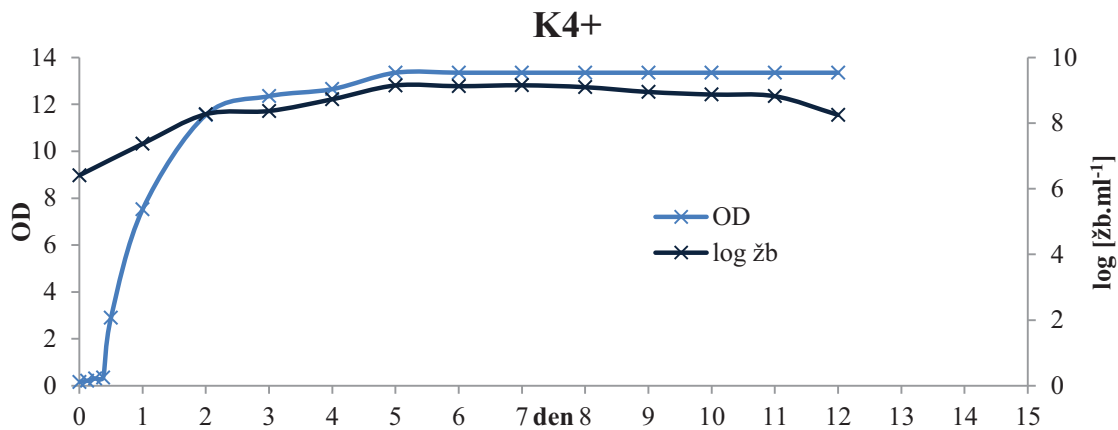
Graf 16: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 1, prostředí K+)



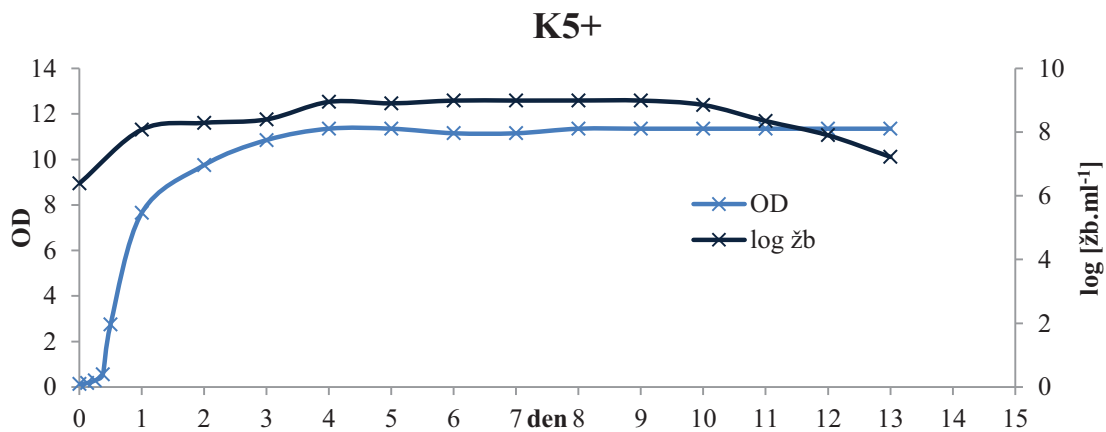
Graf 17: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 2, prostředí K+)



Graf 18: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 3, prostředí K+)

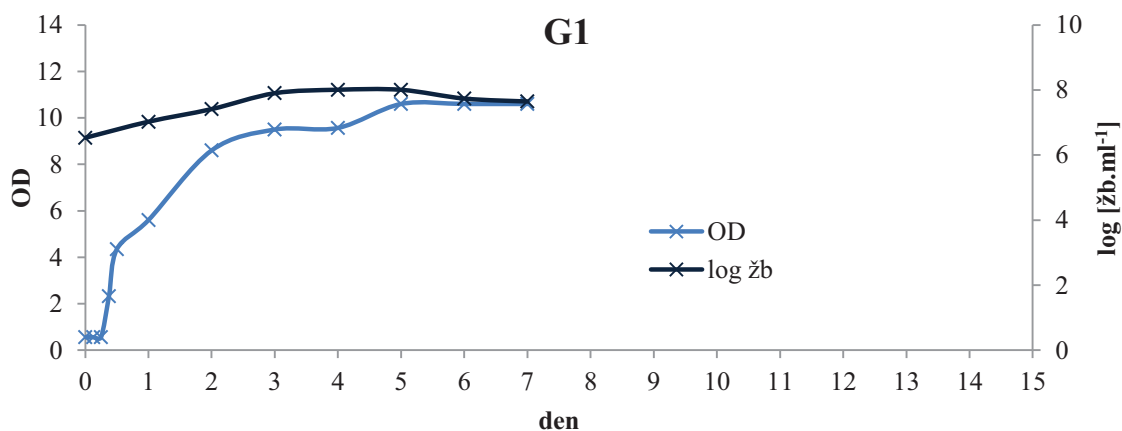


Graf 19: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 4, prostředí K+)

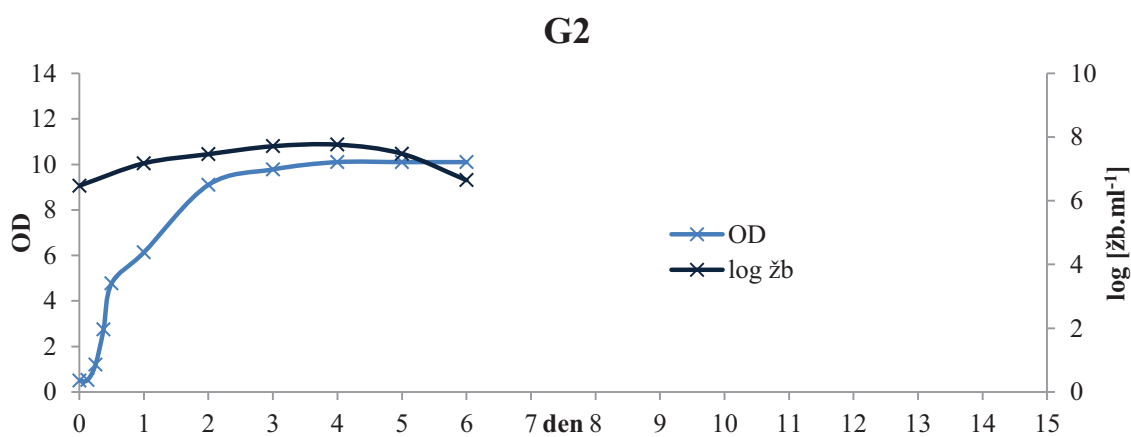


Graf 20: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 5, prostředí K+)

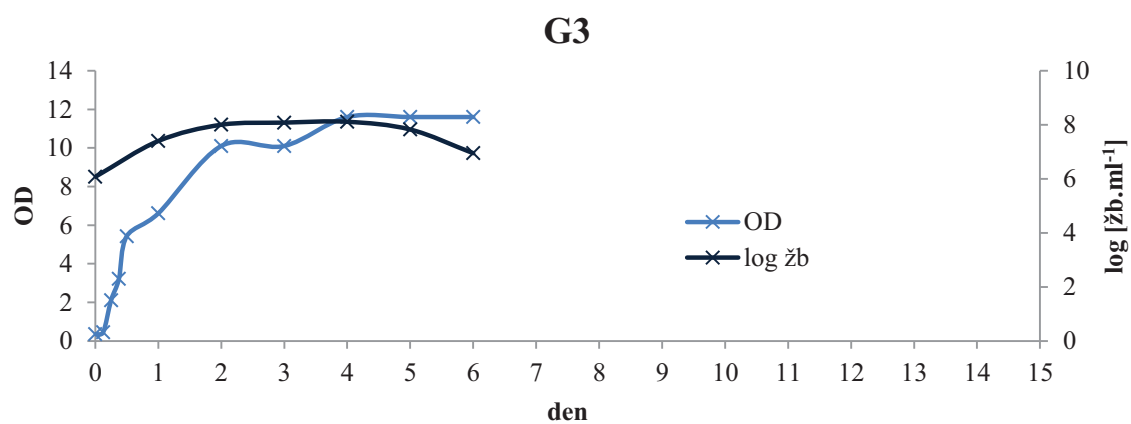
Růstové křivky kvasinek 1 – 5 v prostředí G



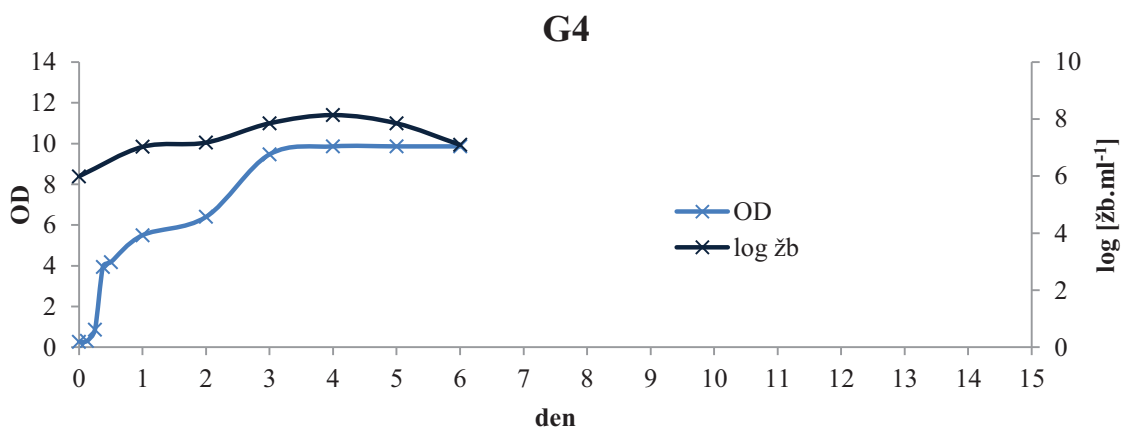
Graf 21: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 1, prostředí G)



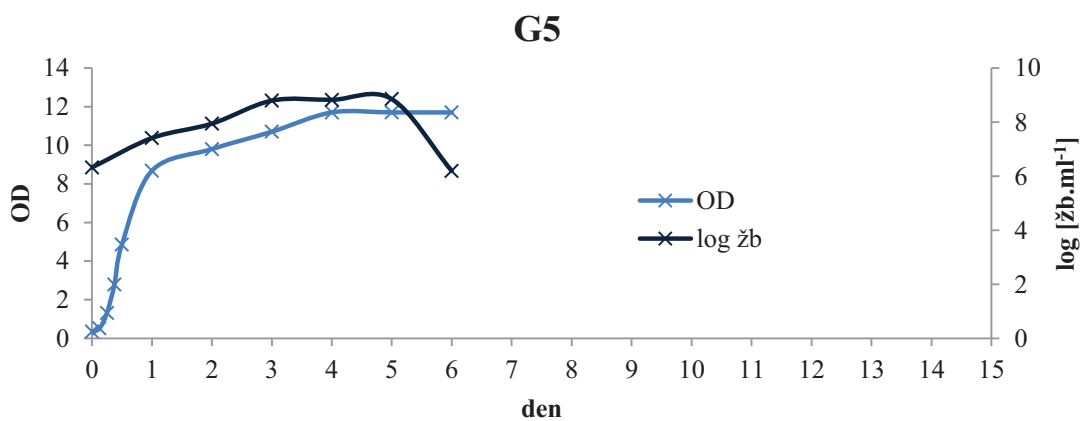
Graf 22: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 2, prostředí G)



Graf 23: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 3, prostředí G)

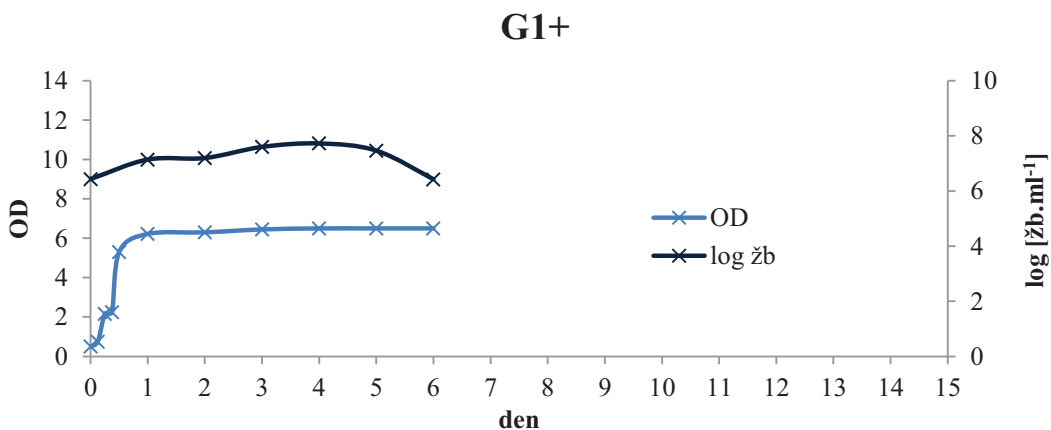


Graf 24: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 4, prostředí G)

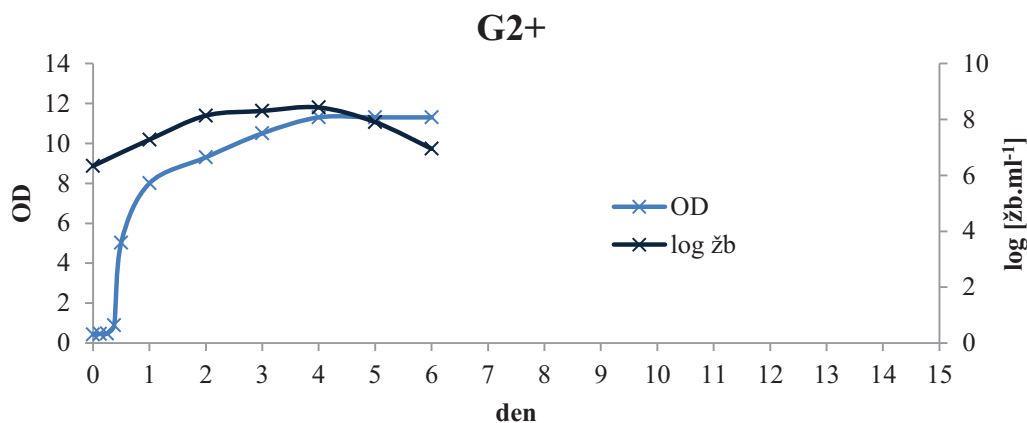


Graf 25: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 5, prostředí G)

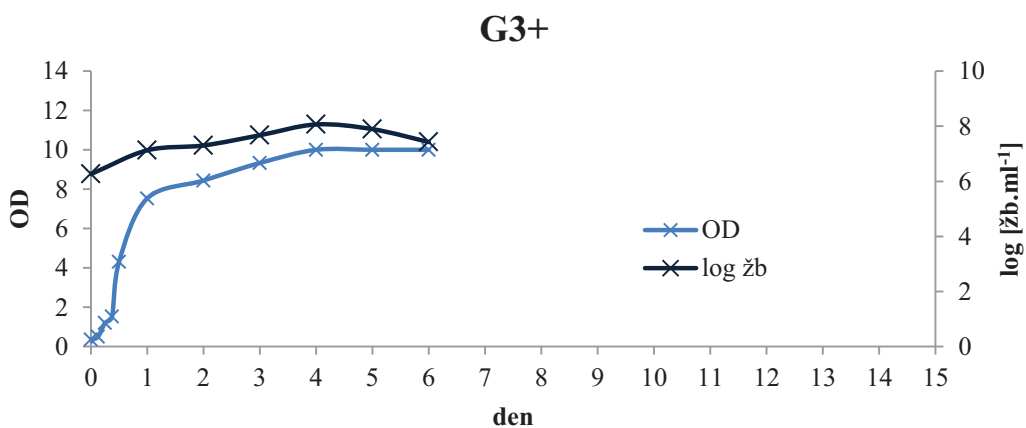
Růstové křivky kvasinek 1 – 5 v prostředí G+



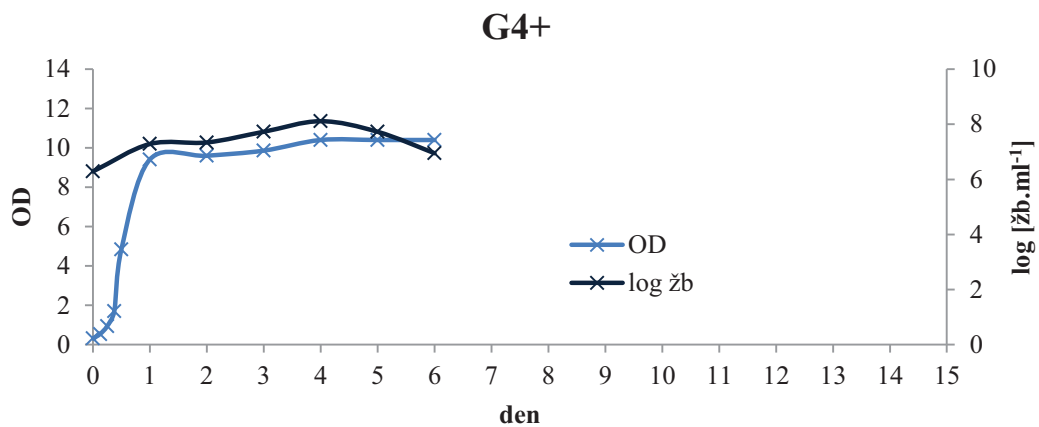
Graf 26: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 1, prostředí G+)



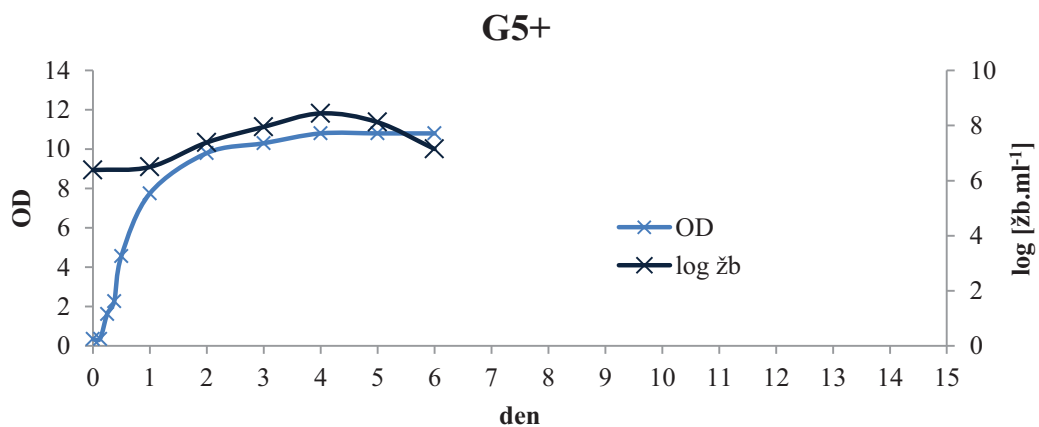
Graf 27: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 2, prostředí G+)



Graf 28: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 3, prostředí G+)

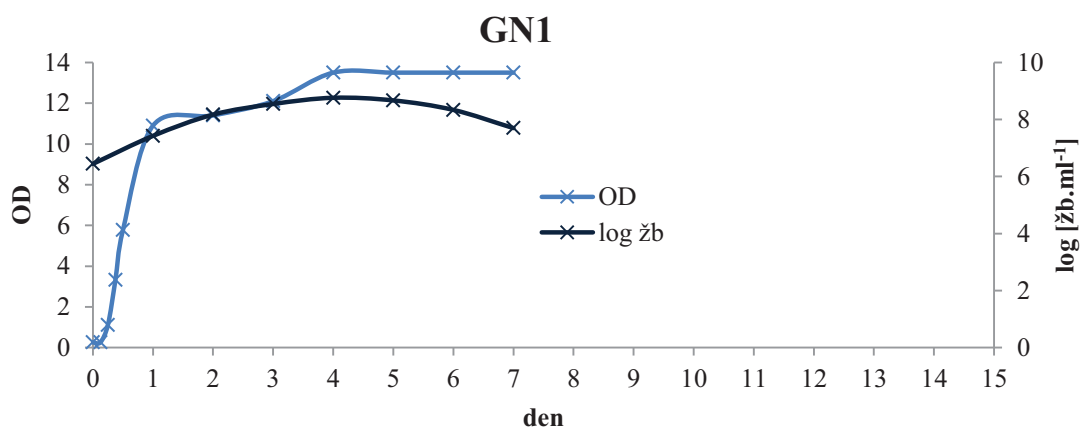


Graf 29: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 4, prostředí G+)

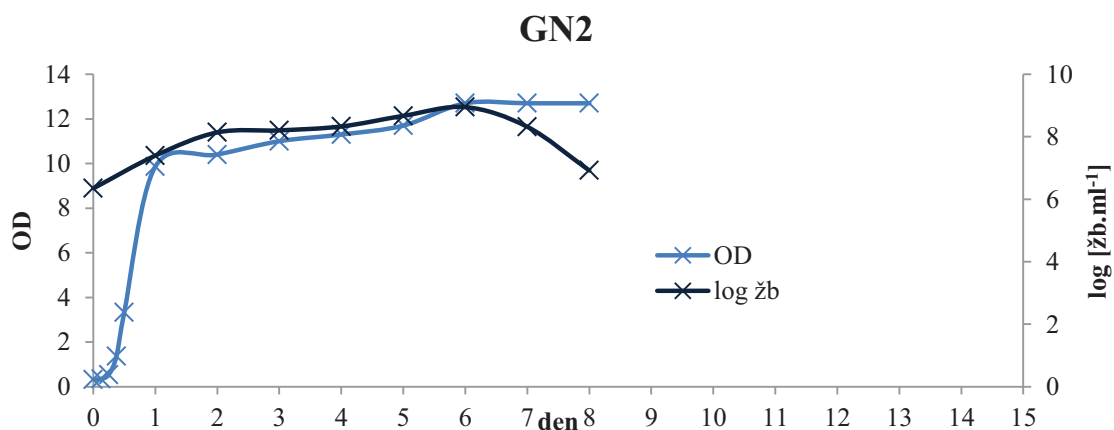


Graf 30: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 5, prostředí G+)

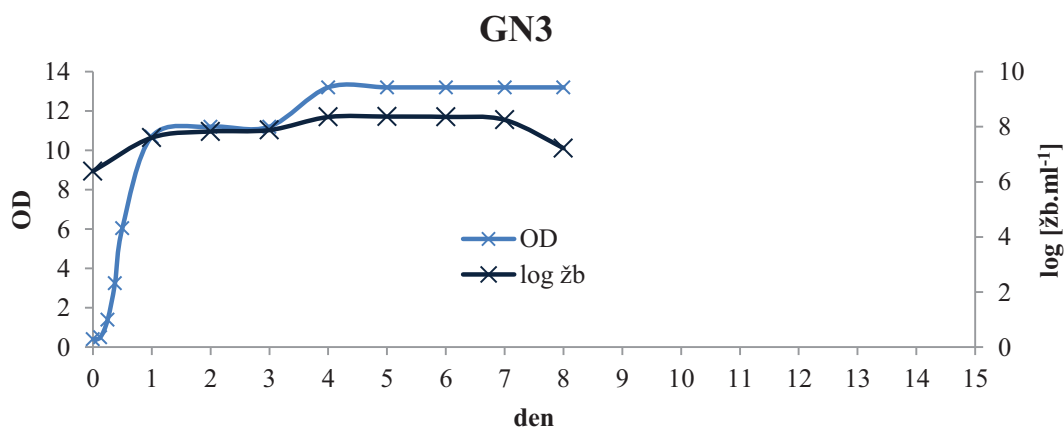
Růstové křivky kvasinek 1 – 5 v prostředí GN



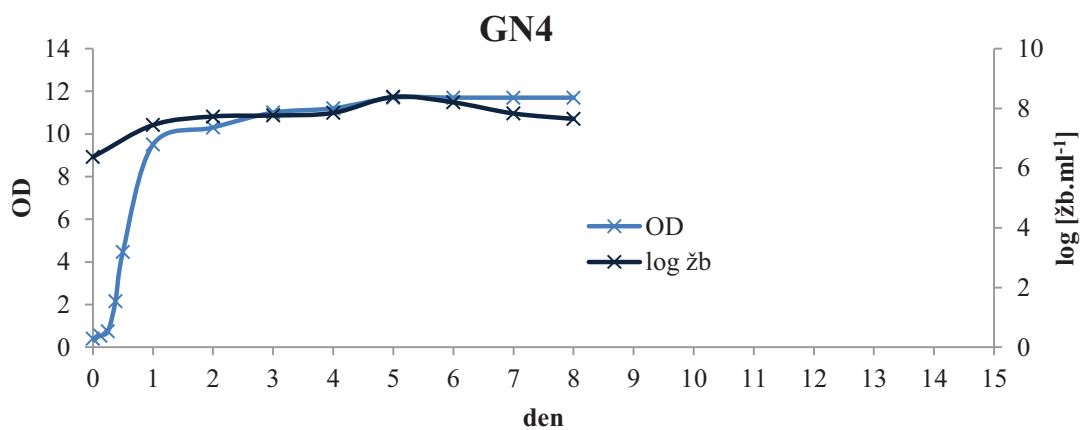
Graf 31: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 1, prostředí GN)



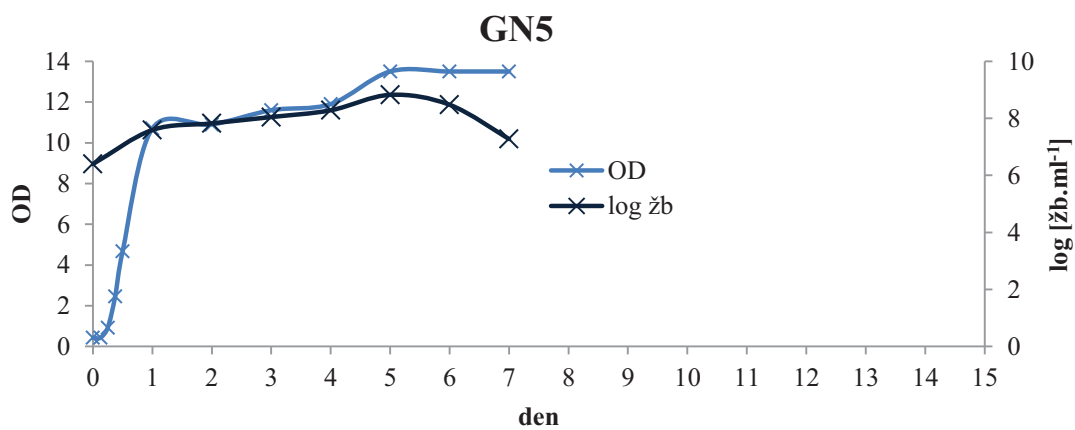
Graf 32: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 2, prostředí GN)



Graf 33: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 3, prostředí GN)



Graf 34: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 4, prostředí GN)



Graf 35: Závislost optické hustoty a logaritmu živých buněk na čase (kvasinka 5, prostředí GN)

Příloha 8: Naměřené hodnoty při sledování osmotolerance*Tabulka 6: Naměřené hodnoty optické hustoty v průběhu sledování osmotolerance*

den	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20
vzorek																		
O-1	0,31	1,77	2,75	3,95	4,56	5,63	5,76	5,96	6,21	6,26	6,45	6,50	6,66	6,70	6,80	6,82	6,84	6,84
O-2	0,34	0,48	0,49	0,62	0,84	1,59	2,11	2,50	3,25	3,54	4,23	4,48	4,67	5,10	5,22	5,43	5,60	5,60
O-3	0,80	2,22	3,20	4,34	4,63	4,83	5,53	5,65	5,91	6,14	6,26	6,38	6,45	6,58	6,70	6,72	6,75	6,80
O-4	0,26	0,36	0,61	1,41	2,24	3,29	4,28	4,83	5,18	5,50	5,77	5,97	6,07	6,26	6,29	6,32	6,32	6,32
O-5	0,22	0,31	1,14	2,62	3,21	4,16	4,31	4,75	5,13	5,20	5,44	5,49	5,56	5,58	5,58	5,58	5,58	5,58
O+1	0,12	0,41	2,49	4,98	6,35	7,15	7,68	7,98	8,43	8,51	8,54	8,63	8,85	8,93	8,95	9,34	9,40	9,40
O+2	0,32	0,59	2,52	4,00	5,16	5,32	5,69	6,25	6,75	7,00	7,21	7,36	7,48	7,82	7,90	7,90	7,90	7,90
O+3	0,50	0,52	2,18	4,25	5,41	6,47	6,71	7,48	7,86	7,97	8,09	8,12	8,19	8,21	8,21	8,26	8,31	8,31
O+4	0,30	0,49	2,12	3,80	4,71	5,42	5,49	6,34	6,40	6,63	6,77	6,80	7,02	7,10	7,34	7,34	7,34	7,34
O+5	0,26	0,36	0,90	1,79	3,33	4,92	6,41	7,35	7,92	8,32	8,37	8,37	8,40	8,42	8,42	8,42	8,42	8,42

Příloha 9: Naměřené hodnoty při sledování tolerance k alkoholu

Tabulka 7: Naměřené hodnoty optické hustoty v průběhu sledování tolerance k alkoholu

den	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20
kvasinka	1 % ethanolu																	
1	0,56	7,02	7,80	8,10	8,27	9,40	9,90	9,90	9,90	10,00	10,00	10,00	10,20	10,20	10,20	10,20	10,20	10,20
2	0,47	7,30	7,30	7,60	7,80	8,15	9,10	9,50	9,80	10,50	10,50	10,80	10,90	10,90	10,90	10,90	10,90	10,90
3	0,57	8,06	9,40	9,80	10,30	10,30	10,90	11,10	11,10	11,10	11,10	11,40	11,40	11,40	11,40	11,40	11,40	11,40
4	0,67	6,64	7,87	7,90	8,50	9,60	10,20	10,20	10,20	10,30	10,30	10,60	11,10	11,10	11,10	11,10	11,10	11,10
5	0,91	6,80	8,15	8,70	9,20	9,20	9,20	9,40	9,60	10,20	10,20	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50
kvasinka	4 % ethanolu																	
1	0,50	6,86	8,30	8,60	8,60	8,90	9,10	9,10	9,20	9,40	9,50	9,80	9,90	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10
2	0,60	4,60	7,41	7,58	8,06	8,80	9,20	9,60	9,80	9,80	10,20	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50
3	0,61	6,08	7,77	8,30	8,70	8,90	8,90	9,10	9,10	9,10	9,50	9,80	9,80	10,10	10,10	10,10	10,10	10,10
4	0,35	6,50	7,55	7,70	8,70	9,20	9,30	9,30	9,50	9,50	9,90	9,90	10,30	10,50	10,50	10,50	10,50	10,50
5	0,58	6,65	8,26	8,80	8,80	9,00	9,20	9,20	9,50	9,70	9,90	9,90	10,20	10,30	10,30	10,30	10,30	10,30
kvasinka	8 % ethanolu																	
1	0,27	3,68	5,72	6,96	7,36	8,20	8,35	8,50	8,55	8,62	8,69	8,75	8,88	8,88	8,90	9,20	9,20	9,20
2	0,23	4,30	5,39	5,80	6,54	7,77	8,20	8,40	8,60	8,85	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90	9,10
3	0,22	4,18	6,17	6,80	7,30	7,81	7,91	8,02	8,20	8,40	8,56	8,70	8,70	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80
4	0,25	1,34	4,90	6,90	7,81	8,40	8,50	8,61	8,75	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	8,80	9,20
5	0,33	5,13	6,98	7,41	7,81	8,15	8,20	8,20	8,20	8,25	8,40	8,50	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90	8,90

Tabulka 7: Pokračování

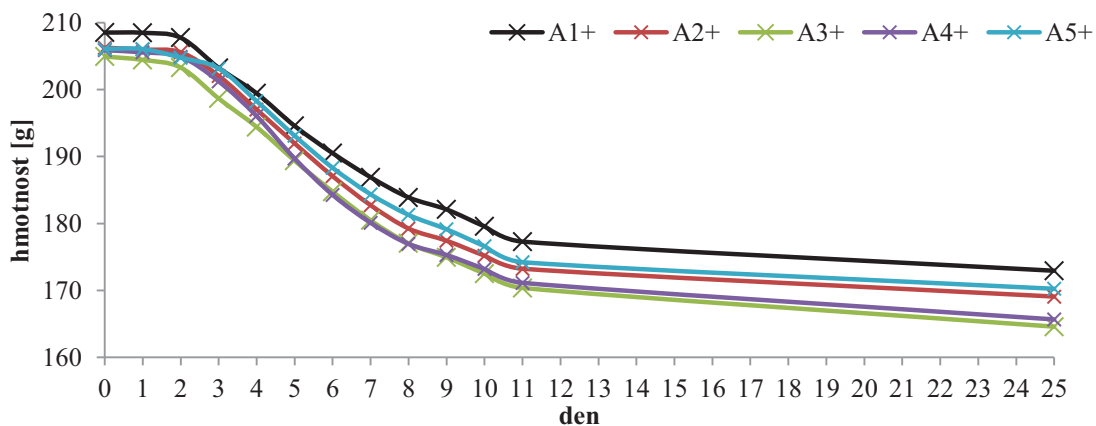
kvasinka	12 % ethanolu																		
1	0,22	1,62	3,39	4,46	5,31	6,09	6,24	6,35	7,18	7,30	7,45	7,53	7,80	7,95	7,95	7,95	7,95	7,95	7,95
2	0,31	0,41	0,46	1,54	3,40	4,33	4,80	4,85	4,87	4,93	5,15	5,36	5,44	5,44	5,44	5,44	5,44	5,44	6,30
3	0,29	0,96	2,65	5,20	5,73	5,90	6,05	6,11	6,27	6,36	6,47	6,52	6,76	6,88	6,88	6,88	6,88	6,88	7,00
4	0,22	0,78	1,18	1,90	3,29	3,84	3,86	4,14	4,22	4,26	4,54	4,66	4,90	5,08	5,12	5,53	6,07	6,07	6,07
5	0,53	1,65	4,05	4,55	5,71	5,90	6,12	6,25	6,36	6,36	6,40	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43
kvasinka	16 % ethanolu																		
1	0,15	0,37	0,43	0,45	0,47	0,48	0,48	0,51	0,51	0,51	0,52	0,58	0,58	0,74	0,74	0,94	1,15	2,90	2,90
2	0,26	0,30	0,32	0,33	0,34	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
3	0,58	0,65	0,67	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
4	0,12	0,29	0,30	0,30	0,30	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
5	0,63	0,92	1,15	1,54	2,23	4,47	4,82	4,90	5,45	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50	5,50
kvasinka	18 % ethanolu																		
1	0,18	0,23	0,25	0,27	0,30	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
2	0,22	0,32	0,33	0,33	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
3	0,30	0,36	0,37	0,45	0,50	0,51	0,51	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54
4	0,20	0,20	0,20	0,20	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
5	0,40	0,42	0,42	0,42	0,43	0,60	0,60	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96

Příloha 10: Hodnoty naměřené v průběhu sledování fermentace

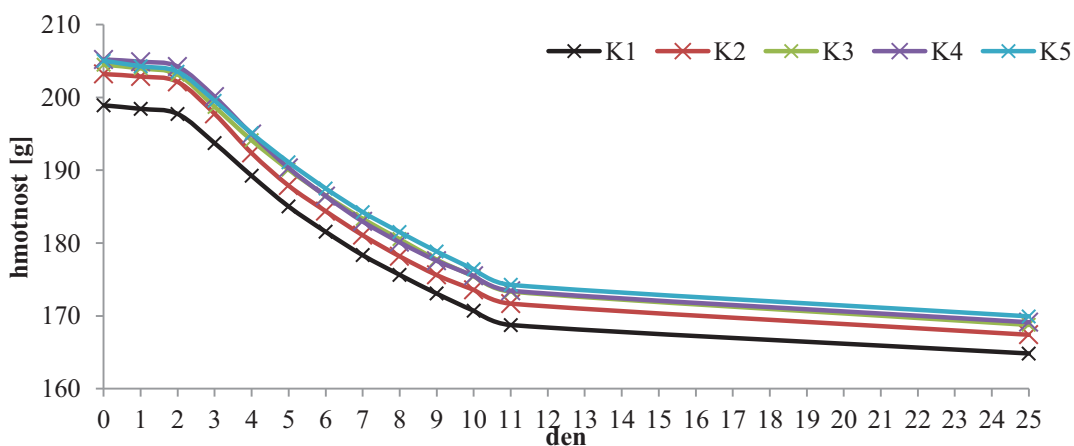
Tabulka 8: Hmotnosti média v průběhu fermentace

Den Mošt	hmotnost [g]												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	25
A1	208,53	208,23	207,64	202,91	197,90	193,17	188,97	185,08	181,76	178,72	176,08	172,77	169,03
A2	205,95	205,80	205,45	202,26	197,73	192,62	188,34	183,89	180,04	176,48	173,84	171,48	167,31
A3	205,84	205,64	204,94	200,77	195,50	190,79	186,25	182,26	178,87	175,74	173,15	170,92	166,41
A4	205,95	205,69	205,27	202,13	197,10	191,81	186,97	182,57	178,82	175,58	173,03	170,91	166,67
A5	204,58	204,53	204,31	200,97	196,72	192,51	187,87	183,70	180,09	176,61	173,59	171,16	166,81
A1+	208,54	208,50	207,77	203,26	199,45	194,58	190,51	186,91	183,89	182,10	179,56	177,28	172,93
A2+	206,27	206,00	205,59	202,06	197,03	191,97	187,07	182,73	179,24	177,42	175,19	173,23	169,07
A3+	204,96	204,45	203,31	198,68	194,42	189,39	184,76	180,46	177,02	174,93	172,51	170,36	164,57
A4+	205,90	205,58	201,24	204,60	196,05	189,71	184,28	180,10	176,93	175,29	173,19	171,12	165,65
A5+	206,09	206,07	204,79	203,17	198,29	193,11	188,32	184,36	181,28	179,13	176,60	174,21	170,23
K1	198,92	198,43	197,74	193,72	189,24	185,02	181,55	178,34	175,64	173,07	170,71	168,75	164,84
K2	203,21	202,87	202,14	197,75	192,36	187,88	184,38	181,08	178,18	175,61	173,58	171,68	167,41
K3	204,50	203,99	203,15	198,71	194,12	190,09	186,52	183,34	180,53	177,73	175,44	173,34	168,76
K4	205,21	204,91	204,24	200,09	194,97	190,32	186,45	182,96	180,10	177,57	175,49	173,45	169,13
K5	205,04	204,28	203,53	199,54	195,08	191,09	187,50	184,26	181,50	178,85	176,41	174,26	169,94
K1+	198,27	197,66	196,79	192,25	188,30	184,21	180,76	177,69	175,01	173,41	171,33	169,15	164,69
K2+	202,96	202,83	201,98	197,89	193,74	189,45	185,42	182,14	179,75	178,58	176,66	174,82	171,70
K3+	198,72	198,41	197,68	193,79	190,28	186,60	183,22	180,08	177,46	175,76	173,50	171,45	167,88
K4+	205,67	205,10	204,32	199,75	196,33	190,70	186,84	183,54	180,99	179,67	177,67	175,82	171,45
K5+	201,70	201,25	200,53	196,61	193,35	189,44	185,84	182,68	179,96	178,19	175,88	173,63	169,48

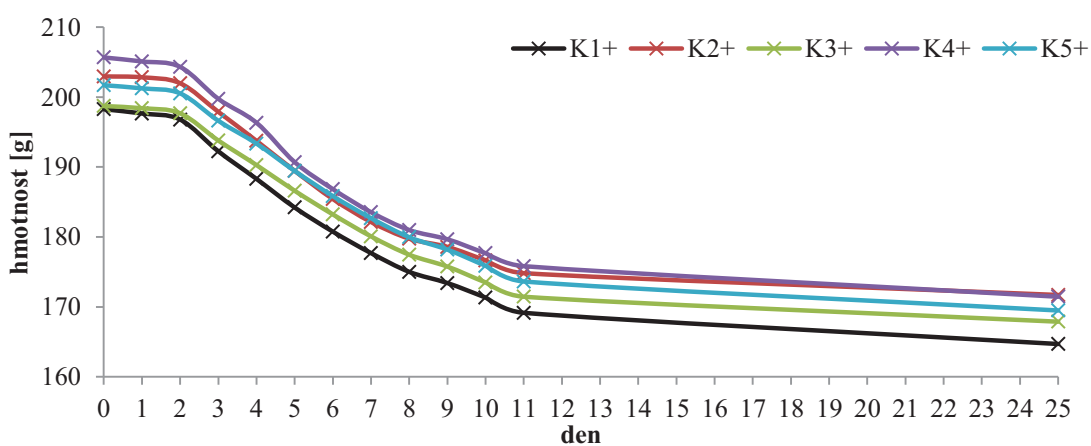
Příloha 11: Grafické znázornění hmotnosti médií v průběhu fermentace



Graf 36: Hmotnost média v jednotlivých dnech – prostředí A+



Graf 37: Hmotnost média v jednotlivých dnech – prostředí K



Graf 38: Hmotnost média v jednotlivých dnech – prostředí K+

Příloha 12: Výsledky sledování průběhu fermentace

Tabulka 9: Změna hmotnosti média v průběhu fermentace

dt	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	Σdm [g]
prostředí	dm/dt													
A1	0	0,31	0,59	4,73	5,01	4,73	4,20	3,89	3,32	3,04	2,64	2,31	0,34	35,1
A2	0	0,15	0,34	3,20	4,53	5,11	4,28	4,45	3,85	3,56	2,64	2,36	0,30	34,8
A3	0	0,20	0,70	4,17	5,27	4,71	4,54	3,99	3,39	3,13	2,59	2,23	0,32	35,2
A4	0	0,26	0,42	3,14	5,03	5,29	4,84	4,45	3,70	3,24	2,55	2,12	0,30	35,3
A5	0	0,05	0,21	3,35	4,25	4,21	4,64	4,12	3,66	3,48	3,02	2,43	0,32	33,7
A1+	0	0,04	0,73	4,51	4,81	4,87	4,07	3,60	3,02	2,79	2,54	2,28	0,31	33,6
A2+	0	0,27	0,41	3,53	5,53	5,56	4,90	4,34	3,49	2,82	2,23	1,96	0,30	35,3
A3+	0	0,51	1,14	4,63	5,26	5,03	4,63	4,30	3,44	3,09	2,42	2,15	0,41	37,0
A4+	0	0,32	0,66	3,68	5,19	6,34	5,43	4,18	3,17	2,64	2,10	2,07	0,39	36,2
A5+	0	0,02	0,28	3,60	4,90	5,18	4,79	3,96	3,08	3,15	2,53	2,19	0,30	34,0
K1	0	0,49	0,69	4,02	4,48	4,22	3,47	3,21	2,70	2,57	2,36	1,96	0,28	30,4
K2	0	0,34	0,73	4,39	5,39	4,48	3,50	3,30	2,90	2,57	2,03	1,90	0,30	31,8
K3	0	0,51	0,84	4,44	4,59	4,03	3,57	3,18	2,81	2,80	2,29	2,10	0,33	31,5
K4	0	0,30	0,67	4,15	5,12	4,65	3,87	3,49	2,86	2,53	2,08	2,04	0,31	32,1
K5	0	0,46	0,75	3,99	4,46	3,99	3,59	3,24	2,76	2,65	2,44	2,15	0,31	30,8
K1+	0	0,61	0,87	4,54	4,95	4,09	3,45	3,07	2,68	2,60	2,08	2,18	0,32	31,4
K2+	0	0,13	0,85	4,09	5,15	4,29	4,03	3,28	2,39	2,27	1,92	1,84	0,22	30,5
K3+	0	0,31	0,73	3,89	4,51	3,68	3,38	3,14	2,62	2,70	2,26	2,05	0,26	29,5
K4+	0	0,57	0,78	4,57	4,42	5,63	3,86	3,30	2,55	2,32	2,00	1,85	0,31	32,2
K5+	0	0,45	0,72	3,92	4,26	3,91	3,60	3,16	2,72	2,77	2,31	2,25	0,30	30,4

Příloha 13: Naměřené hodnoty a výsledky stanovení redukujících sacharidů

Tabulka 10: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A, kvasinka 1)

Prostředí A1								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.Γ ⁻¹]	c ₂ [g.Γ ⁻¹]	c ₃ [g.Γ ⁻¹]	ředění	c [g.Γ ⁻¹]
0	0,648	0,652	0,615	185,480	186,608	176,172	5000	182,753 ± 5,292
1	0,412	0,404	0,442	118,915	116,658	127,376	5000	120,983 ± 5,221
3	0,327	0,317	0,299	94,940	92,119	87,042	5000	91,367 ± 3,698
5	0,312	0,302	0,326	72,567	70,311	75,726	4000	72,868 ± 2,513
7	0,647	0,648	0,647	37,040	37,096	37,040	1000	37,058 ± 0,030
9	0,637	0,633	0,639	18,238	18,125	18,294	500	18,219 ± 0,080
11	0,333	0,335	0,332	9,663	9,720	9,635	500	9,673 ± 0,040
25	0,522	0,525	0,522	2,999	3,016	2,999	100	3,004 ± 0,009

Tabulka 11: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A, kvasinka 2)

Prostředí A2								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.Γ ⁻¹]	c ₂ [g.Γ ⁻¹]	c ₃ [g.Γ ⁻¹]	ředění	c [g.Γ ⁻¹]
0	0,648	0,652	0,615	185,480	186,608	176,172	5000	182,753 ± 5,292
1	0,600	0,595	0,578	171,941	170,531	165,736	5000	169,403 ± 3,005
3	0,399	0,432	0,428	115,248	124,556	123,428	5000	121,077 ± 4,693
5	0,364	0,356	0,367	84,301	82,496	84,978	4000	83,925 ± 1,185
7	0,668	0,672	0,675	38,224	38,450	38,619	1000	38,431 ± 0,186
9	0,584	0,589	0,582	16,743	16,884	16,686	500	16,771 ± 0,094
11	0,215	0,218	0,216	6,335	6,420	6,363	500	6,372 ± 0,040
25	0,505	0,504	0,508	2,903	2,897	2,920	100	2,907 ± 0,011

Tabulka 12: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A, kvasinka 3)

Prostředí A3								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.Γ ⁻¹]	c ₂ [g.Γ ⁻¹]	c ₃ [g.Γ ⁻¹]	ředění	c [g.Γ ⁻¹]
0	0,648	0,652	0,615	185,480	186,608	176,172	5000	182,753 ± 5,292
1	0,579	0,597	0,585	166,018	171,095	167,710	5000	168,274 ± 2,388
3	0,371	0,383	0,385	107,350	110,735	111,299	5000	109,795 ± 1,973
5	0,280	0,282	0,289	65,347	65,798	67,377	4000	66,174 ± 0,985
7	0,599	0,609	0,611	34,332	34,896	35,009	1000	34,745 ± 0,335
9	0,539	0,541	0,544	15,474	15,530	15,615	500	15,539 ± 0,066
11	0,275	0,276	0,274	8,027	8,056	7,999	500	8,027 ± 0,026
25	0,485	0,485	0,486	2,790	2,790	2,796	100	2,792 ± 0,003

Tabulka 13: Naměřené absorpance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A, kvasinka 4)

Prostředí A4								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,648	0,652	0,615	185,480	186,608	176,172	5000	182,753 ± 5,292
1	0,478	0,488	0,501	137,530	140,351	144,018	5000	140,633 ± 3,005
3	0,382	0,375	0,369	110,453	108,479	106,786	5000	108,572 ± 1,696
5	0,293	0,285	0,289	68,280	66,475	67,377	4000	67,377 ± 0,834
7	0,526	0,516	0,513	30,214	29,650	29,480	1000	29,781 ± 0,355
9	0,618	0,615	0,609	17,702	17,617	17,448	500	17,590 ± 0,119
11	0,210	0,215	0,229	6,194	6,335	6,730	500	6,420 ± 0,257
25	0,506	0,501	0,508	2,909	2,880	2,920	100	2,903 ± 0,019

Tabulka 14: Naměřené absorpance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A, kvasinka 5)

Prostředí A5								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,648	0,652	0,615	185,480	186,608	176,172	5000	182,753 ± 5,292
1	0,468	0,457	0,449	134,710	131,607	129,351	5000	131,889 ± 2,486
3	0,401	0,409	0,412	115,812	118,069	118,915	5000	117,598 ± 1,482
5	0,365	0,379	0,372	84,526	87,685	86,106	4000	86,106 ± 1,459
7	0,738	0,748	0,750	42,173	42,737	42,850	1000	42,587 ± 0,335
9	0,945	0,943	0,949	26,925	26,869	27,038	500	26,944 ± 0,080
11	0,398	0,395	0,396	11,497	11,412	11,440	500	11,450 ± 0,040
25	0,495	0,491	0,496	2,847	2,824	2,852	100	2,841 ± 0,014

Tabulka 15: Naměřené absorpance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A+, kvasinka 1)

Prostředí A1+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,656	0,648	0,679	187,736	185,480	194,224	5000	189,146 ± 4,194
1	0,496	0,513	0,518	142,607	147,402	148,813	5000	146,274 ± 3,005
3	0,319	0,314	0,325	92,683	91,273	94,376	5000	92,777 ± 1,435
5	0,248	0,236	0,240	58,126	55,418	56,321	4000	56,622 ± 1,274
7	0,449	0,446	0,442	25,870	25,701	25,475	1000	25,682 ± 0,183
9	0,446	0,445	0,449	12,850	12,822	12,935	500	12,869 ± 0,054
11	0,289	0,284	0,287	8,422	8,281	8,366	500	8,356 ± 0,066
25	0,492	0,490	0,495	2,830	2,818	2,847	100	2,831 ± 0,013

Tabulka 16: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A+, kvasinka 2)

Prostředí A2+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,656	0,648	0,679	187,736	185,480	194,224	5000	189,146 ± 4,194
1	0,469	0,459	0,465	134,992	132,171	133,864	5000	133,676 ± 1,312
3	0,262	0,270	0,267	76,606	78,863	78,017	5000	77,829 ± 1,053
5	0,259	0,253	0,255	60,608	59,254	59,706	4000	59,856 ± 0,637
7	0,253	0,256	0,250	14,814	14,983	14,644	1000	14,814 ± 0,156
9	0,232	0,235	0,230	6,814	6,899	6,758	500	6,824 ± 0,066
11	0,836	0,832	0,831	4,770	4,748	4,742	100	4,753 ± 0,014
25	0,506	0,508	0,511	2,909	2,920	2,937	100	2,922 ± 0,013

Tabulka 17: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A+, kvasinka 3)

Prostředí A3+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,656	0,648	0,679	187,736	185,480	194,224	5000	189,146 ± 4,194
1	0,620	0,613	0,609	177,582	175,608	174,480	5000	175,890 ± 1,451
3	0,378	0,382	0,375	109,325	110,453	108,479	5000	109,419 ± 0,920
5	0,320	0,329	0,325	74,372	76,403	75,501	4000	75,425 ± 0,940
7	0,420	0,426	0,429	24,234	24,573	24,742	1000	24,512 ± 0,239
9	0,314	0,318	0,311	9,127	9,240	9,043	500	9,137 ± 0,092
11	0,620	0,628	0,622	3,552	3,597	3,563	100	3,570 ± 0,022
25	0,498	0,500	0,495	2,863	2,875	2,847	100	2,862 ± 0,013

Tabulka 18: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A+, kvasinka 4)

Prostředí A4+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,656	0,648	0,679	187,736	185,480	194,224	5000	189,146 ± 4,194
1	0,531	0,525	0,524	152,479	150,787	150,505	5000	151,257 ± 0,987
3	0,421	0,429	0,426	121,453	123,710	122,863	5000	122,675 ± 1,053
5	0,922	0,924	0,925	52,553	52,665	52,722	1000	52,647 ± 0,080
7	0,271	0,274	0,275	15,829	15,998	16,055	1000	15,961 ± 0,108
9	0,216	0,218	0,217	6,363	6,420	6,391	500	6,391 ± 0,026
11	0,682	0,684	0,682	3,901	3,913	3,901	100	3,905 ± 0,006
25	0,543	0,543	0,541	3,117	3,117	3,106	100	3,114 ± 0,006

Tabulka 19: Naměřené absorpance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí A+, kvasinka 5)

Prostředí A5+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,656	0,648	0,679	187,736	185,480	194,224	5000	189,146 ± 4,194
1	0,587	0,593	0,599	168,274	169,967	171,659	5000	169,967 ± 1,564
3	0,470	0,476	0,479	135,274	136,966	137,812	5000	136,684 ± 1,194
5	0,411	0,415	0,417	94,906	95,809	96,260	4000	95,658 ± 0,640
7	0,585	0,589	0,582	33,542	33,768	33,373	1000	33,561 ± 0,183
9	0,645	0,648	0,650	18,463	18,548	18,604	500	18,539 ± 0,066
11	0,310	0,280	0,290	9,014	8,168	8,450	500	8,544 ± 0,398
25	0,511	0,513	0,515	2,937	2,948	2,959	100	2,948 ± 0,010

Tabulka 20: Naměřené absorpance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K, kvasinka 1)

Prostředí K1								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,532	0,549	0,526	152,761	157,556	151,069	5000	153,796 ± 3,109
1	0,428	0,416	0,420	123,428	120,043	121,171	5000	121,547 ± 1,592
3	0,216	0,219	0,211	63,632	64,478	62,222	5000	63,444 ± 1,053
5	0,528	0,535	0,538	30,327	30,722	30,891	1000	30,646 ± 0,267
7	0,305	0,308	0,299	17,747	17,916	17,409	1000	17,691 ± 0,238
9	0,442	0,449	0,445	12,738	12,935	12,822	500	12,832 ± 0,092
11	0,718	0,722	0,719	4,104	4,127	4,110	100	4,114 ± 0,011
25	0,439	0,444	0,440	2,530	2,559	2,536	100	2,542 ± 0,014

Tabulka 21: Naměřené absorpance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K, kvasinka 2)

Prostředí K2								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,532	0,549	0,526	152,761	157,556	151,069	5000	153,796 ± 3,109
1	0,375	0,371	0,380	108,479	107,350	109,889	5000	108,573 ± 1,175
3	0,209	0,205	0,207	61,657	60,529	61,093	5000	61,093 ± 0,521
5	0,662	0,669	0,660	37,886	38,281	37,773	1000	37,980 ± 0,246
7	0,229	0,226	0,230	13,460	13,291	13,516	1000	13,422 ± 0,108
9	0,672	0,689	0,675	3,845	3,941	3,862	100	3,883 ± 0,047
11	0,501	0,505	0,506	2,880	2,903	2,909	100	2,897 ± 0,014
25	0,452	0,454	0,457	2,604	2,615	2,632	100	2,617 ± 0,013

Tabulka 21: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K, kvasinka 3)

Prostředí K3								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,532	0,549	0,526	152,761	157,556	151,069	5000	153,796 ± 3,109
1	0,418	0,422	0,425	120,607	121,735	122,581	5000	121,641 ± 0,915
3	0,289	0,292	0,285	84,222	85,068	83,094	5000	84,128 ± 0,159
5	0,505	0,507	0,501	29,029	29,142	28,804	1000	28,992 ± 0,104
7	0,308	0,304	0,306	17,916	17,691	17,804	1000	17,803 ± 0,066
9	0,373	0,370	0,375	10,791	10,707	10,848	500	10,782 ± 0,011
11	0,662	0,661	0,665	3,789	3,783	3,806	100	3,792 ± 0,008
25	0,456	0,455	0,458	2,627	2,621	2,638	100	2,628 ± 0,013

Tabulka 22: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K, kvasinka 4)

Prostředí K4								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,532	0,549	0,526	152,761	157,556	151,069	5000	153,796 ± 3,109
1	0,432	0,430	0,425	124,556	123,992	122,581	5000	123,710 ± 0,940
3	0,361	0,358	0,355	104,530	103,684	102,837	5000	103,684 ± 0,782
5	0,781	0,727	0,729	44,599	41,553	41,665	1000	42,605 ± 1,596
7	0,192	0,189	0,185	11,373	11,203	10,978	1000	11,184 ± 0,183
9	0,623	0,629	0,625	3,569	3,602	3,580	100	3,584 ± 0,016
11	0,368	0,370	0,366	2,131	2,141	2,119	100	2,130 ± 0,010
25	0,424	0,423	0,421	2,446	2,440	2,429	100	2,438 ± 0,008

Tabulka 23: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K, kvasinka5)

Prostředí K5								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,532	0,549	0,526	152,761	157,556	151,069	5000	153,796 ± 3,109
1	0,502	0,496	0,506	144,300	142,607	145,428	5000	144,112 ± 1,312
3	0,418	0,412	0,415	120,607	118,915	119,761	5000	119,761 ± 0,782
5	0,624	0,620	0,626	35,742	35,516	35,855	1000	35,704 ± 0,160
7	0,352	0,348	0,35	20,398	20,173	20,285	1000	20,285 ± 0,104
9	0,382	0,383	0,380	11,045	11,074	10,989	500	11,036 ± 0,040
11	0,139	0,139	0,140	4,191	4,191	4,220	500	4,201 ± 0,015
25	0,419	0,421	0,422	2,418	2,429	2,435	100	2,427 ± 0,008

Tabulka 24: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K+, kvasinka 1)

Prostředí K1+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,516	0,535	0,528	148,248	153,607	151,633	5000	151,630 ± 2,504
1	0,486	0,495	0,492	139,787	142,325	141,479	5000	141,197 ± 1,194
3	0,321	0,326	0,319	93,248	94,658	92,684	5000	93,530 ± 0,940
5	0,801	0,798	0,806	45,727	45,558	46,009	1000	45,764 ± 0,210
7	0,262	0,258	0,254	15,321	15,096	14,870	1000	15,096 ± 0,208
9	0,240	0,242	0,238	7,040	7,0967	6,984	500	7,040 ± 0,052
11	0,594	0,594	0,596	3,405	3,405	3,416	100	3,409 ± 0,006
25	0,412	0,410	0,413	2,378	2,367	2,384	100	2,376 ± 0,008

Tabulka 25: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K+, kvasinka 2)

Prostředí K2+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,516	0,535	0,528	148,248	153,607	151,633	5000	151,630 ± 2,504
1	0,456	0,446	0,452	131,325	128,505	130,197	5000	130,009 ± 1,312
3	0,356	0,351	0,350	103,120	101,709	101,427	5000	102,085 ± 0,838
5	0,927	0,928	0,930	52,835	52,891	53,004	1000	52,910 ± 0,080
7	0,178	0,172	0,175	10,583	10,244	10,414	1000	10,413 ± 0,156
9	0,720	0,722	0,725	4,116	4,127	4,144	100	4,129 ± 0,013
11	0,416	0,415	0,413	2,401	2,395	2,384	100	2,393 ± 0,008
25	0,388	0,388	0,390	2,243	2,243	2,254	100	2,247 ± 0,006

Tabulka 26: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K+, kvasinka 3)

Prostředí K3+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,516	0,535	0,528	148,248	153,607	151,633	5000	151,63 ± 2,504
1	0,478	0,476	0,474	137,530	136,966	136,402	5000	136,966 ± 0,521
3	0,394	0,399	0,395	113,838	115,248	114,120	5000	114,402 ± 0,689
5	0,818	0,817	0,82	46,686	46,629	46,799	1000	46,705 ± 0,080
7	0,339	0,337	0,342	19,665	19,552	19,834	1000	19,684 ± 0,131
9	0,27	0,272	0,269	7,886	7,943	7,859	500	7,896 ± 0,040
11	0,793	0,793	0,795	4,528	4,528	4,539	100	4,561 ± 0,006
24	0,436	0,436	0,435	2,514	2,514	2,509	100	2,512 ± 0,003

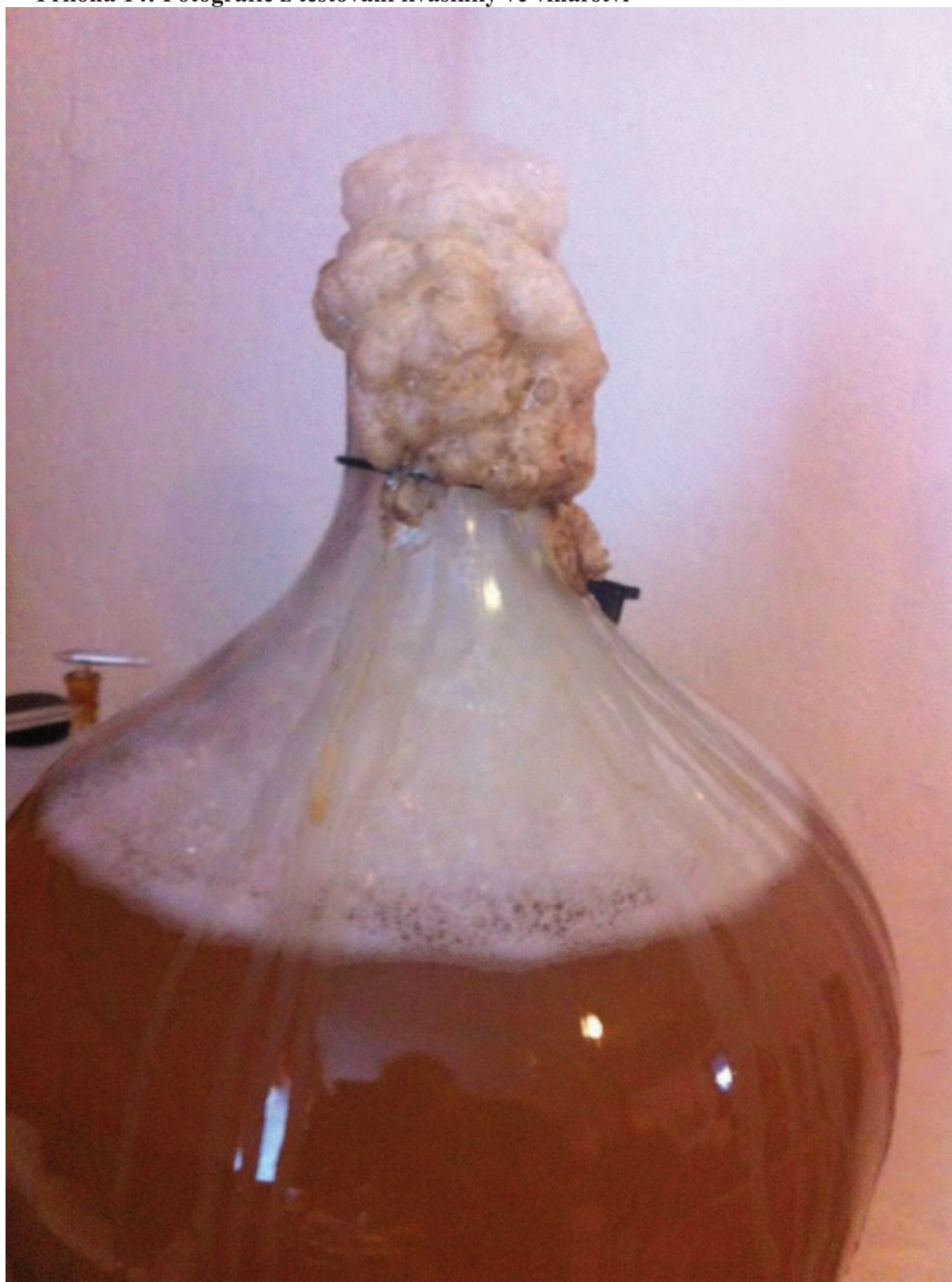
Tabulka 27: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K+, kvasinka 4)

Prostředí K4+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,516	0,535	0,528	148,248	153,607	151,633	5000	151,63 ± 2,504
1	0,444	0,449	0,445	127,94	129,351	128,222	5000	127,940 ± 0,690
3	0,293	0,291	0,296	85,35	84,786	86,196	5000	85,444 ± 0,660
5	0,856	0,857	0,859	48,830	48,886	48,999	1000	48,905 ± 0,080
7	0,176	0,171	0,173	10,470	10,188	10,301	1000	10,319 ± 0,131
9	0,467	0,465	0,466	2,689	2,677	2,683	100	2,683 ± 0,005
11	0,413	0,415	0,414	2,384	2,395	2,390	100	2,390 ± 0,005
24	0,333	0,333	0,335	1,933	1,933	1,944	100	1,936 ± 0,006

Tabulka 28: Naměřené absorbance a koncentrace redukujících sacharidů v průběhu fermentace (prostředí K+, kvasinka 5)

Prostředí K5+								
den	A ₁	A ₂	A ₃	c ₁ [g.l ⁻¹]	c ₂ [g.l ⁻¹]	c ₃ [g.l ⁻¹]	ředění	c [g.l ⁻¹]
0	0,516	0,535	0,528	148,248	153,607	151,633	5000	151,630 ± 2,504
1	0,416	0,407	0,413	120,043	117,504	119,197	5000	118,915 ± 1,194
3	0,266	0,269	0,261	77,734	78,581	76,324	5000	77,546 ± 1,053
5	0,181	0,185	0,182	43,008	43,910	43,234	4000	43,384 ± 0,434
7	0,355	0,358	0,356	20,568	20,737	20,624	1000	20,643 ± 0,080
9	0,430	0,431	0,433	12,399	12,427	12,484	500	12,437 ± 0,040
11	0,893	0,893	0,892	5,092	5,092	5,087	100	5,090 ± 0003
25	0,459	0,459	0,461	2,643	2,643	2,655	100	2,647 ± 0,006

Příloha 14: Fotografie z testování kvasinky ve vinařství



Obrázek 26: Testování kvasinky 5 ve vinařství