



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

IZOLACE A IDENTIFIKACE KVASINEK Z VINICE PRO JEJICH MOŽNÉ VYUŽITÍ K VÝROBĚ VÍNA

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF YEASTS FROM THE VINEYARD TO THEIR POSSIBLE UTILISATION
IN WINE MAKING

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Lenka Fialová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP1008/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Lenka Fialová	
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:

Izolace a identifikace kvasinek z vinice pro jejich možné využití k výrobě vína

Zadání diplomové práce:

1. Vyhledání vhodné a dostupné literatury k danému tématu
2. Provedení izolačních postupů k získání kvasinek z prostředí vinice
3. Využití molekulárně biologických metod k identifikaci izolovaných kvasinek
4. Shrnutí a zhodnocení získaných výsledků formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Lenka Fialová
Student(ka)

Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Cílem této práce byla izolace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* z povrchu bobulí révy vinné odrůd Malverina a Sauvignon. Pro identifikaci izolovaných kvasinek byla využita metoda PCR-RFLP. Polymerázovou řetězovou reakcí byl amplifikován úsek 5,8S ITS rDNA, ohraničený primery ITS1 a ITS4. Pro následnou restriční analýzu byly využity endonukleázy *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI* a *TaqI*. Výsledky byly zpracovány UPGMA shlukovou analýzou v programu BioNumerics.

Dominantními kvasinkami na povrchu bobulí odrůdy Malverina byly kvasinky rodu *Brettanomyces/Dekkera*, zatímco na povrchu bobulí odrůdy Sauvignon byly dominantní kvasinky rodu *Pichia*. Druh *Saccharomyces cerevisiae* nebyl izolován ze žádné z těchto dvou odrůd.

ABSTRACT

The aim of this work was to isolate the *Saccharomyces cerevisiae* yeast from the surface of wine grapes of the Malverina and Sauvignon varieties. Isolated yeasts were identified by the PCR-RFLP method. 5,8S ITS rDNA was amplified using PCR, and restriction endonucleases *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI* and *TaqI* were used for the restriction analysis which followed. The results were processed by UPGMA cluster analysis using the BioNumerics programme.

The dominant genus on the surface of the Malverina variety grapes was *Brettanomyces/Dekkera*, while on the surface of the Sauvignon grapes we found mainly yeasts of the *Pichia* genus. The *Saccharomyces cerevisiae* species was not isolated from any of the two grape varieties.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kvasinky, identifikace, PCR-RFLP

KEYWORDS

Yeasts, identification, PCR-RFLP

FIALOVÁ, L. *Izolace a identifikace kvasinek z vinice pro jejich možné využití k výrobě vína*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 50 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

Děkuji vedoucí své diplomové práce, Mgr. Daně Vránové, Ph. D. za odborné vedení a rady při zpracování diplomové práce. Dále děkují paní Radce Novákové za pomoc při přípravě kulturačních médií a sterilních pomůcek.

Obsah

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Víno	8
2.1.1	Technologie výroby vína	8
2.1.2	Malverina	11
2.1.3	Sauvignon	11
2.2	Vinné kvasinky	12
2.2.1	Morfologie	12
2.2.2	Cytologie	12
2.2.3	Metabolismus kvasinek	15
2.2.4	Kvasinky důležité z potravinářského a biotechnologického hlediska.....	16
2.3	Polymerázová řetězová reakce	18
2.4	Elektroforéza nukleových kyselin.....	19
2.5	Restrikční endonukleázy	19
2.6	PCR-RFLP	20
3	Experimentální část.....	21
3.1	Chemikálie	21
3.2	Přístroje a pomůcky.....	21
3.3	Použité roztoky a kultivační média	22
3.3.1	Kultivační médium.....	22
3.3.2	Kultivační médium s antibiotikem a kyselinou propionovou	22
3.3.3	Ethidium bromid	22
3.3.4	10x TBE pufr	23
3.3.5	1x TBE pufr	23
3.3.6	2 % agarózový gel pro elektroforetickou detekci DNA fragmentů	23
3.3.7	Octanový pufr.....	23
3.3.8	PCR směs.....	23
3.4	Pracovní postupy	24

3.4.1	Izolace kultur kvasinek	24
3.4.2	Izolace DNA	24
3.4.3	PCR	25
3.4.4	Elektroforetická detekce PCR produktů	26
3.4.5	Podmínky elektroforézy	26
3.4.6	Přečištění PCR produktů	26
3.4.7	Restrikční analýza	27
3.4.8	Elektroforetická detekce restrikčních fragmentů	27
3.4.9	Podmínky elektroforézy	28
3.4.10	Zpracování výsledků v programu BioNumerics	28
4	Výsledky a diskuse	29
4.1	Identifikace kvasinek izolovaných z bobulí odrůdy Malverina	29
4.1.1	Amplifikace DNA izolovaných kvasinek pomocí PCR	29
4.1.2	Restrikční analýza	29
4.1.3	Genetická podobnost izolovaných kvasinek	33
4.2	Identifikace kvasinek izolovaných z bobulí odrůdy Sauvignon	35
4.2.1	Amplifikace DNA izolovaných kvasinek pomocí PCR	35
4.2.2	Restrikční analýza	35
4.2.3	Genetická podobnost izolovaných kvasinek	39
5	Závěr	42
6	Seznam použité literatury	43
7	Seznam použité literatury pro obrázky	46
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	47
9	Přílohy	48
9.1	Příloha 1: Fotodokumentace odběru vzorků	48
9.2	Příloha 2: Ukázky elektroforeogramů	49

1 ÚVOD

Hrozny, mošt i víno mají svou vlastní, velmi bohatou mikroflóru, ke které patří kvasinky, bakterie a vláknité houby. Její složení závisí na různých faktorech, jako je např. množství srážek, teplota, či agrochemické zásahy. V případě hroznů je složení mikroflóry také ovlivněno stupněm jejich zralosti a fyziologickým stavem. Zastoupení kvasinek je u nijak nepoškozených bobulí odlišné než u bobulí s porušenou slupkou, či napadených plísní.

Kvasinky lze identifikovat mikroskopickými (světelná, fluorescenční či elektronová mikroskopie), biochemickými (sledování asimilace různých uhlíkatých substrátů, potřeby růstových faktorů, či tolerance k ethanolu) i molekulárně-genetickými metodami.

Cílem této práce byla izolace a identifikace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* z bobulí vinné révy odrůd Malverina a Sauvignon. Pro dosažení tohoto cíle byla využita metoda PCR-RFLP, patří mezi molekulárně genetické metody. Je založena na amplifikaci určité sekvence DNA, v našem případě úseku 5,8S – rDNA, vymezeného primery ITS1 a ITS4, a jeho štěpení restrikčními endonukleázami na fragmenty specifické pro různé rody a druhy kvasinek. Pro tuto práci byly využity endonukleázy HaeIII, HhaI, HinfI a TaqI.

Získané fragmenty byly vizualizovány elektroforeticky a zpracovány v programu BioNumerics UPGMA shlukovou analýzou, jejímž výstupem byly dendrogramy genetické podobnosti. Délky restrikčních fragmentů všech zkoumaných vzorků byly také srovnány s odbornými články a fakultní databází, a na základě tohoto srovnání byly izolované kultury zařazeny k příslušným rodům a druhům.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Víno

Víno bylo považováno za zdravý nápoj již od starověku. Obsahuje mnoho zdraví prospěšných látek, např. flavonoidy, vitaminy, aminokyseliny, minerální látky a stopové prvky. Bylo také dokázáno, že pravidelná konzumace malého množství vína (maximálně 4 dl denně u mužů a 2 dl denně u žen) snižuje krevní tlak a hladinu LDL cholesterolu a naopak zvyšuje hladinu HDL cholesterolu. Víno také zdůrazňuje chuť jídla a napomáhá trávení.

Jeho výroba je ovšem náročný proces, protože vlastnosti základní suroviny, vinných hroznů, závisí na klimatických podmínkách, které jsou každý rok jiné, a tím pádem i obsah různých chemických látek, např. cukrů a kyselin, je každý rok odlišný. Různé druhy vín také mají specifické potřeby a požadavky na výrobu. [3, 7, 21]

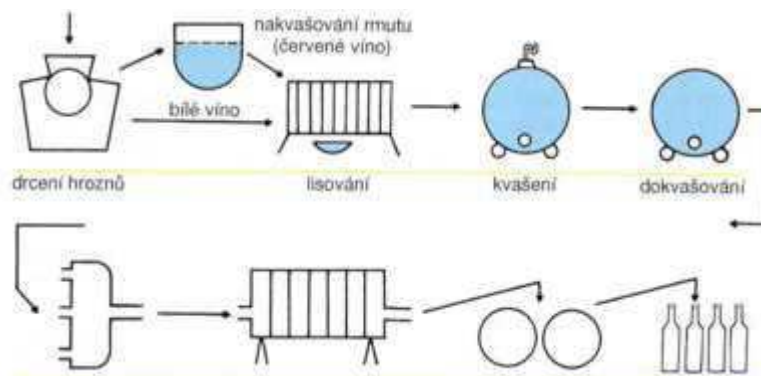
2.1.1 Technologie výroby vína

2.1.1.1 *Zpracování hroznů na mošt*

Výrobu vína lze rozdělit do dvou částí, a to zpracování hroznů na mošt a zpracování moštu na víno. Prvním krokem při zpracování hroznů je sklizeň. Její začátek je určen vyzrálostí hroznů (pokud by hrozny byly nedostatečně vyzrálé, hrozí problémy s kvašením kvůli nedostatečnému množství využitelného dusíku), jejich zdravotním stavem, a také požadovaným typem vína. Sklizeň by měla probíhat při suchém počasí, jinak hrozí naředění moštu vodou z povrchu orosených hroznů. [7, 8]

Po sklizni následuje zpracování hroznů na mošt. Tato fáze výroby, která by zároveň měla proběhnout ve stejný den jako sklizeň, začíná dopravou a přejímkou hroznů. Při dopravě by nemělo dojít k mechanickému poškození hroznů. Poškozené bobule jsou citlivější na napadení mikroorganismy a náchylnější k nežádoucím biochemickým dějům, jako je např. naoctění, neboli přeměna cukrů na kyselinu octovou působením octových bakterií. Zabránit mechanickému poškození při manipulaci s hrozny lze využitím samospádu či pásových dopravníků. Je-li nutné použít potrubí a hadice, obojí by měly mít velký průřez. [2, 9]

Další fází výroby vína je odstopkování. Jedná se o oddělení bobulí od třepin, a jeho účelem je zabránit extrakci nežádoucích látek (zejména fenolů a chlorofylů) ze stopek hroznů do moštu, a tím pádem i zamezit vzniku nežádoucích sensorických vlastností. [2, 9]



Obrázek 1: Zjednodušené schéma výroby vína [3]

Odstopkované hrozny jsou poté mlety. Mletím bobulí vzniká rmut, neboli směs rozdrčených bobulí, semen a zbytků třepin, které nebyly odstraněny při odstopkování. Mletí musí proběhnout tak, aby výtěžek moštu byl co nejvyšší, ale zároveň nesmí dojít k rozdrčení semen a třepin, které by mělo za následek zhoršení sensorických vlastností moštu a později i vyrobeného vína.

Mletí je následováno odzrňováním, tedy oddělováním semen od rmutu na vystíracích nebo odstředivkových odzrňovačích, kdy jsou semena zachycována v perforovaném válci, a rmut je zachycen do sběrné nádrže. U červených vín je rmut provzdušněn a nakvašen (macerován), u bílých vín je tento postup prováděn jen zřídka a kratší dobu než u vín červených. Macerace probíhá v otevřených dřevěných či plastových kádích, nádobách s ponorným roštem pro zachycení matolin, nebo v uzavřených dubových kádích s poklopem pro plnění v horní části a se dvířky pro vyprázdnění ve stěně nádoby. [22]

Po nakvašení je rmut scezován – oddělí se nejkvalitnější část moštu, tzv. samotok, od tuhých zbytků bobulí, tzv. matolin. Matoliny jsou následně lisovány a je získána další frakce moštu. Proces probíhá pomalu, s občasným přerušením. Vylisované matoliny nesmí v lisu zůstat dlouho, jinak hrozí kontaminace moštu bakteriemi a jeho následné octovatění, případně i zapaření matolin a množení octových mušek. [2, 9]

2.1.1.2 Kvašení moštu

Po zpracování hroznů na mošt následuje kvašení. Pokud je to nutné, může být před kvašením upraven např. obsah cukru v moštu nebo jeho kyselost metodami přesně určenými příslušnou legislativou, konkrétně zákonem č. 321/2004 Sbírky o vinohradnictví a vinařství, a nařízením Evropského Parlamentu a Rady č. 1308/2013.

Dále se provádí síření moštu, tedy přídavek oxidu siřičitého, sloužící k inaktivaci oxidačních enzymů a nežádoucích mikroorganismů. Síření má příznivý vliv jak na průběh kvašení, tak i na sensorické vlastnosti vína. Oxid siřičitý je však také alergen, který může u citlivějších jedinců způsobovat zdravotní problémy. Jsou proto testovány různé metody, které by mohly síření nahradit. [8, 9, 20]

Při samotné fermentaci jsou cukry v moštu metabolizovány nejprve glykolýzou na pyruvát. Na tuto metabolickou dráhu navazuje dekarboxylace pyruvátu na acetaldehyd, která je následována redukcí acetaldehydu na ethanol. [14]

V současnosti jsou při výrobě vína využívány dva způsoby fermentace: řízená a spontánní. Pro spontánní fermentaci jsou využívány tzv. divoké kvasinky, tedy kvasinky přirozeně přítomné v moštu. V počáteční fázi spontánního kvašení převládají nad rodem *Saccharomyces* divoké kvasinky jiných rodů, ale po zvýšení obsahu ethanolu se prosadí *Saccharomyces cerevisiae*, která je proti jeho vyšším koncentracím odolnější. [14]

Při řízené fermentaci je mošt zasířen a následně zaočkován komerční kulturou *Saccharomyces cerevisiae*. Tento postup zabraňuje prosazení nežádoucích kvasinek a znehodnocení vína, ale nedávné studie zjistily, že vína vyrobená pomocí řízené fermentace mohou mít chudší aromatický profil, než vína vyrobená pomocí fermentace spontánní. Probíhají tedy proto studie zkoumající kvalitu vína vyrobeného z moštu zaočkovaného směsnou kulturou, obsahující kromě rodu *Saccharomyces* také kvasinky rodů *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Torulaspóra* či *Pichia*, nebo vína, u kterých byl mošt nejprve zaočkován směsnou kulturou výše uvedených kvasinek, a kultura *Saccharomyces cerevisiae* byla přidána později. Obě metody poskytly vína s unikátním aroma. [14, 15]

Proces kvašení lze rozdělit do tří fází, přímo souvisejících s růstovými fázemi kvasinkové populace. První z nich je latence neboli adaptace, následována fází exponenciálního růstu. Tato fáze trvá 3 – 6 dní, vzniká při ní přibližně třetina obsahu ethanolu a spotřebuje se většina živin. Exponenciální růst je následován stacionární fází, trvající 2 – 10 dní. Vznikají zbývající dvě třetiny obsahu ethanolu a zastavuje se růst kvasinek. Se zvyšující se koncentrací ethanolu, nedostatkem živin a s osmotickým a ethanolovým stresem přechází fáze stacionární do fáze odumírání a fermentace postupně končí. [14].

2.1.1.3 Zrání a školení vína

Během zrání vína probíhají další biochemické procesy ovlivňující organoleptické vlastnosti vína. Nejdůležitější z nich je malolaktická fermentace, tedy dekarboxylace kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou, vylučování vinného kamene a procesy samočištění vína.

Dochází také k autolýze kvasinek a uvolnění buketních látek z jejich odumřelých buněk. U bílých vín bývá obvykle zrání dlouhé půl roku až dva roky. [8, 9, 14]

Po ukončení zrání vína následuje jeho školení. Jedná se o soubor úprav, které dotváří organoleptické vlastnosti vína. První z těchto úprav je čiření, tedy srážení tříslovin, těžkých kovů a jemných koloidních látek. Následuje stabilizace, která zahrnuje adsorpci zbylých koloidních látek na bentonit a chlazení na teplotu blízkou 0 °C, které vyvolá srážení hydrogenvinanu draselného. Posledním krokem při školení vína je pastérace a filtrace. Dostatečně zralé a vyškolené víno je stáčeno do lahví. [9]

2.1.2 Malverina

Tato odrůda pochází z České republiky. Jedná se o odrůdu interspecifickou (křížence), jehož rodiče jsou Veltlínské červené a Merlot. Vyžaduje dobré polohy s vlhkými a hlinitými půdami, a poskytuje pravidelně vysoký výnos.

Vyznačuje se středně velkými, pětiúhelníkovými listy a středně hustým olistěním, středně velkými a středně hustými hrozny, a malými, kulatými, červenošedými bobulemi. Dozrává pomalu, bobule dosahují sklizňové zralosti v první polovině října.



Obrázek 2: Hrozen odrůdy Malverina [4]

Tato odrůda je středně odolná proti mrazu a velmi odolná proti houbovým chorobám. Lze ji většinou pěstovat i bez chemické ochrany, a je tedy vhodná i pro ekologickou a integrovanou produkci. Poskytuje kvalitní, plná, kořenitá vína se skořicovými tóny. [1, 2]

2.1.3 Sauvignon

Tato odrůda pochází z Francie. Charakteristické jsou pro ni malé až středně velké, hluboce vykrajované pětilaločné listy světle zelené barvy s vlnitým povrchem a husté, malé,

válcovité hrozny. Její bobule jsou žlutozeleně zbarvené a aromatické, malé až střední velikosti, a s pevnou slupkou. Podobně jako obě výše uvedené odrůdy i Sauvignon dozrává pozdě a dosahuje sklizňové zralosti v první polovině října.

Sauvignon je poměrně málo odolný proti houbovým chorobám a mrazu, a náročný na polohu – vyžaduje velmi dobrá stanoviště chráněná proti mrazům. Poskytuje střední, méně pravidelný výnos, ale vyrobená vína bývají velmi kvalitní a dlouho uchovatelná v lahvi. Typická je pro něj broskvová či kopřivová chuť, ale může mít i černorybízové a muškátové tóny. [1, 2, 10]

2.2 Vinné kvasinky

Kvasinky jsou v mikroflóře vína jednoznačně dominantní. Vyskytují se na povrchu hroznů, kam se dostávají z ovzduší a pomocí hmyzu. Jejich množství a zastoupení závisí na stupni zralosti hroznů a na jejich zdravotním stavu. Na povrchu nezralých hroznů bývají dominantní kvasinky rodů *Rhodotorula*, *Candida* a *Cryptococcus*, zatímco na povrchu zralých hroznů převažují rody *Kloeckera* a *Metschnikowia*. [3]

Jedná se o nejjednodušší (jednobuněčné) heterotrofní eukaryotní organismy, patřící mezi houby (*Fungi*). Jejich biomasa se skládá převážně z makromolekul proteinů, polysacharidů, lipidů a nukleových kyselin. Většina druhů dokáže zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy na ethanol a oxid uhličitý. [4, 16]

2.2.1 Morfologie

Kvasinkové buňky mají nejčastěji elipsoidní, případně vejčité, nebo kulovité tvar, ale některé rody mohou tvořit i buňky dlouze protáhlé, citronovité trojúhelníkovité, či válcovité. Šířka buněk se obvykle pohybuje mezi 3 – 6 μm , jejich delší rozměr bývá 3 – 15 μm .

Na tvar buňky má vliv i způsob, jakým se kvasinky rozmnožují. Např. kvasinky, které pučí pouze na pólech, vytvářejí dlouhá zaškrcovaná vlákna, tzv. pseudomycelium. Kmeny rozmnožující se dělením mohou vytvářet pravé mycelium, nebo se od sebe dceřiná a mateřská buňka oddělí, ale obě si ponechají obdélníkový tvar se zakulacenými rohy. [3, 4]

2.2.2 Cytologie

2.2.2.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna dává buňce tvar a chrání ji před vnějšími vlivy, jako je např. mechanické poškození nebo osmotický šok. Je propustná pro všechny sloučeniny (výjimka jsou sloučeniny vysokomolekulární – polysacharidy a bílkoviny) a může tvořit až 30 % celkové sušiny buňky.

V buněčné stěně kvasinek jsou, narozdíl od ostatních hub, jejichž buněčné stěny obsahují chitin, nejvíce zastoupeny polysacharid glukán a manoprotein manan, které tvoří až

80 % její sušiny. Na jejich zastoupení a uspořádání mají vliv kultivační podmínky a růstová fáze buňky. Vlákná polysacharidů vytváří spleť, která je vyplněna dalšími látkami – bílkovinami (6 – 10 % sušiny stěny), lipidy a fosfolipidy (3 – 10 % sušiny), a fosforečnany, které jsou vázány estericky na hydroxylové skupiny polysacharidů. Právě díky fosforečnanům a karboxylovým skupinám proteinů mají buňky kvasinek negativní náboj, který poté ovlivňuje adsorpci látek z živného média. [3, 4, 6]

2.2.2.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána, neboli plazmalema, je selektivně propustná bariéra, složená převážně z lipidů a proteinů. Je evolučně nejstarším membránovým útvarem, od kterého jsou některé membránové organely (tzv. organely sekreční dráhy) odvozeny. Jedná se také o sídlo transportních mechanismů, ale na rozdíl od bakterií zde nenajdeme systém oxidační fosforylace, který je u eukaryotních organismů, mezi které kvasinky patří, lokalizován na vnitřní membráně mitochondrií.

Cytoplazmatická membrána je volně propustná pouze pro malé molekuly bez náboje, a slouží tedy i jako osmotické rozhraní mezi buňkou a okolním prostředím. [4, 6]

2.2.2.3 Cytoplazma

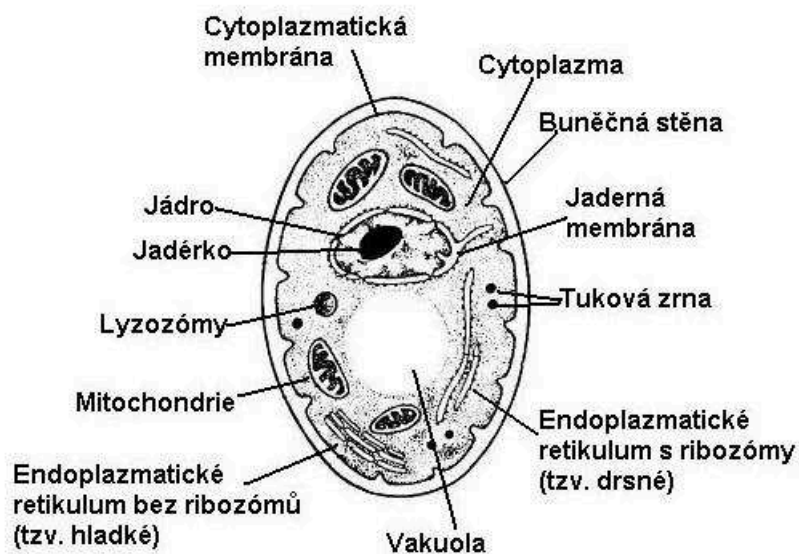
Cytoplazma je hmota vyplňující vnitřní prostor buňky. U mladých kvasinkových buněk je pod mikroskopem homogenní a průhledná, u starších jsou pod mikroskopem viditelná zrníčka a vakuoly.

Kromě vakuol obsahuje cytoplazma i další buněčné organely (spolu s vakuolami je možné zahrnout je pod pojem „nerozpustná složka cytoplazmy“), konkrétně endoplazmatické retikulum, mitochondrie, Golgiho aparát a jádro buňky. Někdy může obsahovat i plazmidy. Soubor všech *rozpustných* komponent buňky se nazývá cytosol. [4, 5, 16]

2.2.2.4 Endoplazmatické retikulum

Endoplazmatické retikulum je systém dvojité membrány, který syntetizuje lipidy a proteiny pro ostatní membránové organely. Retikulum také tvoří oddělení (cisterny) dvojího druhu:

- drsné, na jejichž povrchu jsou navázány ribozomy agregované do polyzomů,
- hladké, ve kterých probíhají různé biosyntézy a přeměny. [4, 6]



Obrázek 3: Idealizovaná kvasinková buňka [5]

2.2.2.5 Golgiho aparát

Jedná se o membránový útvar ve tvaru plochého měchýřku, případně několika propojených měchýřků (diktyozomů), na kterých nikdy nejsou navázány ribozomy. Jeho předpokládaná funkce je transport prekurzorů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. [4, 6]

2.2.2.6 Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonomní buněčné organely o velikosti řádově jednotek mikrometrů, které mohou mít různý tvar, např. kulovitý, válcovitý až vláknitý, nebo laločnatý. V buňce jich může být i několik set a mitochondrie jediné buňky mohou mít velmi odlišné tvary.

Tyto organely jsou tvořeny vnější a vnitřní membránou a mitochondriální hmotou matrix. Vnější membrána je velmi dobře propustná pro polární látky a obsahuje také enzymy metabolismu lipidů. Na vnitřní membráně, zřasené kristami – výběžky směřujícími dovnitř mitochondrie, jsou lokalizovány enzymy dýchacího řetězce a systém oxidační fosforylace. Mitochondriální matrix pak obsahuje enzymy aerobních metabolických drah, jako je např. oxidace mastných kyselin a citrátový cyklus. V mitochondriích jsou také přítomny nukleové kyseliny a aparát pro syntézu bílkovin. [4, 6, 16]

2.2.2.7 Vakuoly

Jedná se o kulovité útvary obklopené jednoduchou membránou. U mladých buněk obvykle najdeme větší počet malých vakuol, kdežto starší buňky nejčastěji obsahují jednu velkou vakuolu, která může vyplňovat i celý prostor buňky.

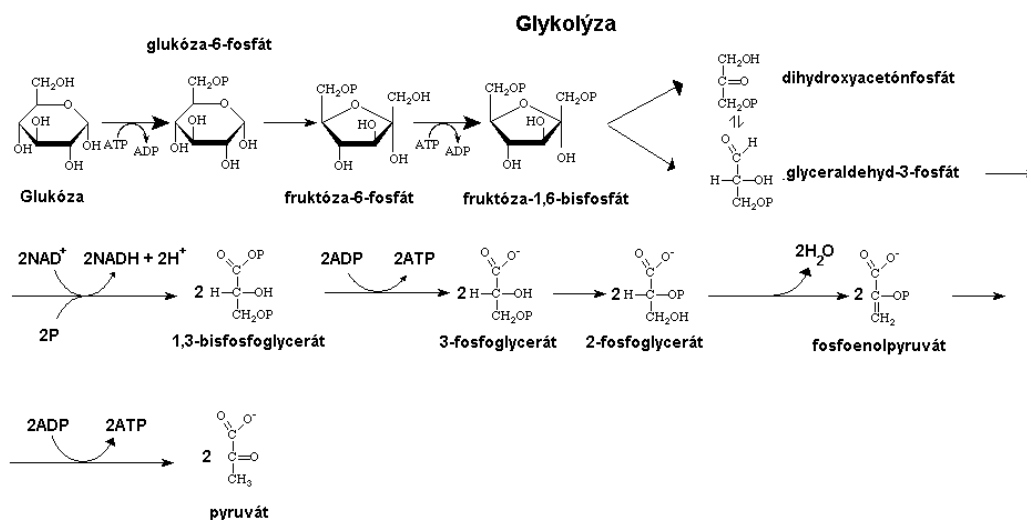
Vakuoly slouží jednak jako rezervoár polyfosfátů, draselných iontů, aminokyselin a purinů, a jednak jako místo rozkladu některých buněčných struktur, jako např. mRNA a některé enzymy (vakuoly obsahují proteinázy, ribonukleázy a esterázy).

2.2.2.8 Jádro

Jádro je útvar obsahující genetickou informaci buňky, zakódovanou v DNA, a je tedy nejdůležitější buněčnou organelou. Je umístěno přibližně ve středu buňky a od cytoplazmy je odděleno dvojitou membránou s velkými póry, které umožňují komunikaci mezi jádrem a cytoplazmou. Stejně jako u jiných eukaryot, i u kvasinek jsou molekuly DNA uspořádány do chromozomů, ale nukleoplazma může obsahovat i nízkomolekulární DNA podobnou bakteriálním plazmidům. [4]

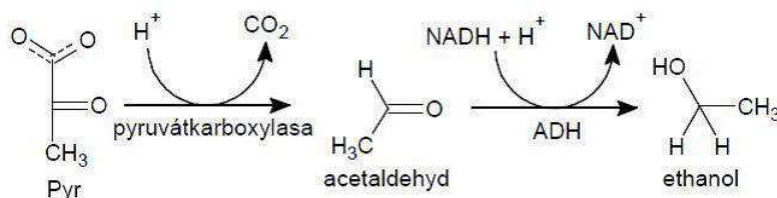
2.2.3 Metabolismus kvasinek

Jednou z nejdůležitějších metabolických drah kvasinek je glykolýza. Jedná se katabolickou dráhu, jejíž reakce jsou u většiny živých organismů stejné. Dochází při ní k postupné fosforylaci hexos za spotřeby dvou molekul ATP až na fruktosa-1,6-bisfosfát, který je následně rozštěpen na dva triosafosfáty – glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát. Tyto tříuhlíkaté sloučeniny jsou poté oxidovány na 1,3-bisfosfoglycerát, který je postupně zpracován přes fosfoenolpyruvát na pyruvát za postupného odštěpení obou fosfátových skupin a vzniku dvou molekul ATP. [4]



Obrázek 4: Glykolýza [1]

Vzniklý pyruvát je u kvasinek za anaerobních podmínek dále zpracován alkoholovým kvašením. Jedná se o dekarboxylaci pyruvátu, následovanou redukcí vzniklého acetaldehydu na ethanol. Vznikající ethanol je ovšem pro kvasinkovou buňku odpadní produkt. Hlavním cílem fermentačních procesů, a tedy i alkoholového kvašení, je reoxidace NADH na NAD⁺. [4]



Obrázek 5: Alkoholové kvašení [2]

Za aerobních podmínek mohou kvasinky zpracovávat uhlíkaté zdroje glykolýzou a citrátovým cyklem. U kmenů s převládajícím anaerobním metabolismem se však projevuje i tzv. Crabtree efekt, kdy vysoká koncentrace glukosy v prostředí inhibuje syntézu enzymů citrátového cyklu a cytochromů dýchacího řetězce, a pyruvát vzniklý glykolýzou je zpracován anaerobně, tedy fermentací. [3]

U kmenů s převládajícím aerobním metabolismem se naopak projevuje Pasteurův efekt. Při dostatku kyslíku v prostředí je glukosa zpracována aerobně, energetický výtěžek je vyšší, spotřeba glukosy se tím pádem snižuje a glykolýza probíhá méně intenzivně. [3]

2.2.4 Kvasinky důležité z potravinářského a biotechnologického hlediska

Podle způsobu pohlavního rozmnožování kvasinky dělíme na rody tvořící askospory, basidiomycetní kvasinky, a rody, které pohlavní spory netvoří.

Skupina kvasinek tvořících askospory se dále dělí do podskupin podle způsobu jejich vegetativního rozmnožování:

- **Vegetativní rozmnožování multilaterálním pučením** – z této podskupiny je nejvýznamnější rod *Saccharomyces*, ale patří sem např. i rody *Kluyveromyces*, *Pichia*, či *Debaryomyces*
- **Vegetativní rozmnožování bipolárním pučením na široké základně** – v této skupině najdeme např. rody *Saccharomycodes* a *Nadsonia*
- **Vegetativní rozmnožování dělením** – tato podskupina je v podstatě přechodem mezi kvasinkami a plísněmi, a patří sem např. rod *Schizosaccharomyces*, *Endomycopsis*, nebo *Eremothecium* [4]

Kvasinky užívané v potravinářském průmyslu musí také mít určité vlastnosti. V případě vinařských kmenů se jedná o schopnost produkovat dostatek ethanolu a zároveň

toleranci k němu, genetickou neměnnost a schopnost růstu při teplotách nižších než 10 °C, vyšší toleranci k oxidu siřičitému, rychlou fermentaci, jejíž vedlejší produkty zároveň nebudou mít nežádoucí organoleptické vlastnosti, a také schopnost dobré sedimentace nebo flokulace. [3, 4]

2.2.4.1 Rod *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* patří mezi kvasinky tvořící askospory a vegetativně se rozmnožuje multilaterálním pučením. Jedná se o technologicky nejdůležitější a nejvíce prostudovaný rod. Tyto kvasinky jsou schopny zkvašovat různé cukry, ale nikdy nevyužívají jako zdroj uhlíku laktózu. Jejich buňky obvykle mají elipsoidní nebo vejčitý tvar.

Nejvýznamnějším druhem je ***Saccharomyces cerevisiae***, ze kterého byly postupně vyšlechtěny kmeny s různým průmyslovým využitím, např. vinařské, lihovarské, nebo pekařské. Tento druh je také využíván pro biochemické a genetické práce jako modelový mikroorganismus, podléhá hexosové represi a zkvašuje glukosu, sacharosu, maltosu, galaktosu a částečně také rafinosu. [4]

Kvasinky rodu *Saccharomyces*, a obzvláště druh *Saccharomyces cerevisiae*, se na povrchu zralých nepoškozených hroznů vyskytují pouze ve velmi nízkých koncentracích. Výskyt těchto kvasinek je také ovlivněn klimatickými faktory, např. množstvím srážek a teplotou, ale také agrochemickými zásahy (postřiky). [27]

2.2.4.2 Rod *Pichia*

Tento rod opět patří mezi kvasinky tvořící askospory. Vegetativní buňky kvasinek tohoto rodu mají protáhlý tvar a tvoří pseudomycelium. Spory bývají oproti tomu kulovité, kloboukovité, saturnovité, či hranaté. Tyto kvasinky mají nízké kvasné schopnosti – zkvašují buď jen glukosu, nebo žádný cukr. Ve špatně uzavřených lahvích piva či vína tvoří kříš. [4]

2.2.4.3 Rod *Metschnikowia*

Tento rod tvoří protáhlé až jehlovité spory, uložené jednotlivě či po dvou v protáhlém, kyjovitém asku. Některé druhy jsou parazity obratlovců, jiné se vyskytují na rostlinách a ovoci. Během výroby vína ale kvasinky tohoto rodu nemusí nutně mít negativní vliv, ale mohou naopak pozitivně ovlivňovat aromatický profil vína. [4, 15]

2.2.4.4 Rod *Brettanomyces*

Tento rod netvoří pohlavní spory, ale jeho sexuální formou (telemorfním stádiem) je rod *Dekkera*. Samostatné buňky mají zašpičatělý, kulovitý, nebo elipsoidní tvar, ale kromě samostatných buněk tvoří tento rod i pseudomycelium a pravé mycelium.

Rod *Brettanomyces/Dekkera*, a obzvláště druhy *Dekkera anomala* a *D. bruxellensis*, se vyskytuje jako kontaminace kvašených nápojů, ve kterých tvoří velké množství kyseliny

octové a také fenolické látky, které vyvolávají zatuchlý pach a chuť (off-flavour). Při výrobě některých druhů piva ale tyto kvasinky naopak mohou mít pozitivní vliv na chuť nápoje.

Byl objeven killer toxin TdKT, produkovaný kvasinkou *Torulaspota delbrueckii*, který díky své glukonázové a chitinázové aktivitě poškozují buněčné stěny a zabíjí kvasinky rodů *Brettanomyces* a *Pichia*. [4, 17, 25, 27]

2.2.4.5 Rod Kloeckera

Tento rod dobře snáší velmi kyselé prostředí a vyskytuje se v nezralých hroznech i v půdě vinic. Je schopen zkvašovat pouze glukózu. Patří mezi kvasinky, které zahajují fermentaci vína. Buňky těchto kvasinek mají na jednom konci zašpičatělý tvar a rozmnožují se bipolárním pučením. [4, 25]

2.2.4.6 Rod Rhodotorula

Často se vyskytuje jako vzdušná kontaminace. Netvoří pohlavní spory a jeho buňky mají kulovitý až elipsoidní tvar. Cukry nezksvašuje, ale zpracovává je v pentózovém cyklu. Buňky tohoto rodu také produkují karotenoidní barviva, která je chrání před ultrafialovou složkou slunečního záření. [4]

2.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla zavedena roku 1985 Kary B. Mullisem. Je to enzymatická metoda založená na principu replikace nukleových kyselin ve směru 5' → 3', umožňující selektivně namnožit určitou nukleotidovou sekvenci bez klonování ve vektorech. Délka amplifikované sekvence může dosáhnout až několika kilobází.

Pro amplifikaci určitého úseku deoxyribonukleotidové kyseliny (DNA) je nejčastěji využívána termostabilní *Taq* DNA polymeráza, izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, která zůstává aktivní i při teplotách využívaných pro denaturaci dvouřetězové DNA.

Pro úspěšný průběh PCR je nutná templátová DNA, *Taq* polymeráza s příslušným pufrům, směs nukleotidů, které slouží jako stavební kameny pro nové molekuly DNA, a také primery, neboli oligonukleotidové sekvence o známém pořadí bází, které se vážou k oběma koncům templátové DNA, ohraničují její požadovaný úsek a slouží jako poznávací znak pro *Taq* polymerázu.

Samotná reakce sestává ze tří fází, probíhající při různých teplotách. První z nich je denaturace matricové dvouřetězové DNA, která vyžaduje teplotu přibližně 95 °C. Následuje ochlazení reakční směsi na teplotu 44 - 65 °C a připojení primerů, neboli annealing. Teplota tohoto kroku závisí na nukleotidovém složení primerů. Po této fázi je teplota opět zvýšena, tentokrát na 70 °C, kdy je DNA polymeráza aktivní, a následuje syntéza nových řetězců

DNA, komplementárních k řetězci templátovému. Vše probíhá v termocykléru, který teplotu mění automaticky v předem naprogramovaných intervalech. Jeden cyklus PCR obvykle trvá 5 – 6 minut a bývá opakován nejčastěji 25 x. [5, 11, 13]

2.4 Elektroforéza nukleových kyselin

Elektroforéza je separační metoda, při které jsou nabité částice odděleny v elektrickém poli na základě jejich pohyblivosti, která souvisí s jejich molekulovou hmotností a velikostí jejich náboje.

Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny. Náboj je v molekule DNA rovnoměrně rozložen, jinak řečeno, velikost náboje na jednotku délky molekuly je vždy stejná, a proto lze stanovit velikost molekuly DNA srovnáním její elektroforetické pohyblivosti s pohyblivostí velikostních standardů.

Pro přípravu elektroforetických gelů jsou nejčastěji využívány polyakrylamid (pro fragmenty o velikosti 10 – 100 párů bází) a agaróza (pro fragmenty délky 100 bp – 50 kb). Hotový gel je složitá síť polymerních molekul.

Pro zviditelnění fragmentů DNA se používají různá barviva. Nejběžnější je ethidiumbromid, interkalační barvivo, které se vmezeřuje mezi sousední páry bází a tvoří s nimi komplex, který po ozáření UV světlem červeně fluoreskuje. Dále je možné použít i fluorescenční kyaninová barviva, známá pod obchodní zkratkou SYBR. Pokud je elektroforéza provedena na polyakrylamidovém gelu, lze využít barvení stříbrem. [5, 11]

2.5 Restrikční endonukleázy

Jedná se o sekvenčně specifické endonukleázy, produkované většinou bakteriálních druhů. V přírodě slouží k likvidaci cizorodé, např. fágové, DNA, která do bakteriální buňky pronikne.

Každá restrikční endonukleáza se váže na DNA ve specifickém, tzv. rozpoznávacím místě, což je sekvence 4 – 8 nukleotidů dvouřetězcové DNA. Tato sekvence často bývá palindromická, ale existují i endonukleázy vázající se na asymetrické sekvence. Uvnitř rozpoznávacího místa se nachází místo restrikční, kde je DNA štěpena. Produktem štěpení jsou restrikční fragmenty definovaných délek s lepivými, nebo tupými konci v závislosti na použitém enzymu. V případě lepivých konců v místě štěpení část jednoho z řetězců DNA, dlouhá několik bází, přesahuje a není vázána k žádné komplementární sekvenci, kdežto v případě tupých konců jsou oba řetězce stejně dlouhé.

Některé restrikční endonukleázy mohou mít za určitých reakčních podmínek hvězdičkovou aktivitu neboli relaxovanou specifitu. Jedná se o schopnost štěpit blízké příbuzné sekvence DNA. [11, 12, 13, 28]

2.6 PCR-RFLP

Analýza polymorfismu délek restrikčních fragmentů, anglicky restriction fragment length polymorphism (RFLP) je jedna z metod využívaných pro identifikaci mikroorganismů. Porovnávají se při ní příbuzné nukleotidové sekvence (např. divoký kmen mikroorganismu s kmenem mutantním). Zakládá se na rozštěpení specifického úseku DNA, namnoženého pomocí PCR, restrikční endonukleázou, detekcí vzniklých restrikčních fragmentů a jejich porovnáním s databází. Pro získání jednoznačných výsledků jsou nutné čisté výchozí kultury mikroorganismů. Kvůli přesnějšímu taxonomickému zařazení studovaných mikroorganismů bývá restrikční analýza provedena s několika různými restrikčními endonukleázami. [12, 13, 27]

Pro identifikaci kvasinek bývá často využívána PCR-RFLP analýza úseků ITS (internal transcribed spacer), ohraničujících geny kódující rRNA. Lze využít i restrikční analýzu úseku 18s rDNA (sekvence kódující RNA malé podjednotky ribozomů). Z uvedených metod poskytuje restrikční analýza ITS úseků vyšší rozlišení. Některé druhy kvasinek (např. *Zygosaccharomyces*) mohou být na základě jejich výsledků zařazeny i do různých kmenů. [27]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 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 20 bp (Takara Bio Inc., Japonsko)
- Délkový standard 100 bp (Elizabeth Pharmacon s. r. o., ČR)
- dNTP mix (Kapa Biosystems, USA)
- Ethanol bezvodý pro UV spektrometrii – C₂H₅OH (Mach chemikálie s. r. o., ČR)
- Ethidium bromid (Serva Biotech, Německo)
- Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon)
- Kyselina propionová (Raechim, Rusko)
- Nanášecí pufr Loading buffer (Fermentas, Litva)
- Parafínový olej
- Primery ITS1, ITS4 (Kapa Biosystems, USA)
- Quant-iT™ ds DNA HS Assay Kit 0,2 – 100 ng
- Restrikční endonukleasy – HaeIII, HinfI, HhaI, Taq⁹¹ (BioLabs, TaKaRa)
- Sladina (pivovar Starobrno s.r.o., ČR)
- Sterilní a deionizovaná voda
- Streptomycin sulfát (HiMedia, Indie)
- Taq DNA polymeráza (Kapa Biosystems, USA)
- CH₃COONa, EDTA, H₃BO₃, HCl, NaOH, Na₂CO₃, Tris

3.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Bakteriologické klíčky
- Buničitá vata
- Bunsenův kahan
- Centrifuga Eppendorf 5430 R (Eppendorf AG, Německo)
- Elektroforetická vana Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (Biotech s.r.o., ČR)
- Exsikátor
- Laboratorní sklo
- 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)

- Mikrozukumavky Eppendorf
- Minicentrifuga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- NanoPhotometer™ UV/Vis (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Parafilm (American Nacional Can™, USA)
- PCR box AURA MINI (Bioair instruments, Itálie)
- Plastové Petriho misky
- Předvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Sušárna (Binder, Německo)
- Sterilní box pro mikrobiologickou práci
- 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)

3.3 Použité roztoky a kultivační média

3.3.1 Kultivační médium

Kultivační médium použité pro experimenty bylo připraveno ze sladivého extraktu takto: Ke 200 ml sladiny v 500 ml odměrném válci byla přidána voda tak, aby cukernatost výsledného roztoku byla 7° ČSN. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 6,8 přidávkem uhličitanu sodného. Připravený roztok byl nalit do Erlenmayerových baněk a byla k němu přidána agarosa tak, aby její koncentrace odpovídala 1 – 3 % hm. Směs byla promíchána varem a následně 20 minut sterilizována. Ze sterilního média byly připraveny agarové plotny nalitím přibližně 15 ml média do výšky 3 – 5 mm na každou Petriho misku. Pro přípravu šikmých agarů byl použit objem média odpovídající ¼ objemu zkumavky. [18]

3.3.2 Kultivační médium s antibiotikem a kyselinou propionovou

Bylo naváženo 0,12 g antibiotika streptomycin sulfát a toto množství bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. Připravený roztok byl přidán k 150 ml sterilního kultivačního média v Erlenmayerově baňce. K takto upravenému médiu bylo dále přidáno 0,375 g kyseliny propionové. Hotové médium bylo rozlito do deseti Petriho misek. [18]

3.3.3 Ethidium bromid

Do mikrozukumavky Eppendorf bylo naváženo 10 mg EtBr. Navážka byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody a připravený roztok byl využit pro vizualizaci fragmentů DNA na gelu. [19]

3.3.4 10x TBE pufr

Nejprve byl připraven 0,5 M roztok EDTA takto: Bylo naváženo 9,36 g EDTA, ke kterému bylo v kádince přidáno 20 ml destilované vody. pH směsi bylo upraveno na hodnotu 8 pomocí koncentrovaného roztoku NaOH. Směs byla promíchávána 30 minut na magnetické míchačce do rozpuštění veškerého EDTA. Připravený roztok byl převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. 40 ml 0,5 M roztoku EDTA bylo poté přeneseno do 1000 ml odměrné baňky. K roztoku bylo přidáno 108 g Tris a 55 g kyseliny borité. Směs byla rozpuštěna v destilované vodě a vzniklý roztok byl doplněn po rysku. [19]

3.3.5 1x TBE pufr

K přípravě pufru pro elektroforetické gely bylo ze zásobního roztoku 10x TBE pufru odebráno 100 ml do 1000 ml odměrné baňky. Roztok byl doplněn destilovanou vodou po rysku.

Pro přípravu vodivostního pufru pro elektroforézu bylo ke 100 ml 10x TBE pufru odebraného do 1000 ml odměrné baňky přidáno 100 μ l EtBr. Roztok byl opět doplněn destilovanou vodou po rysku. [19]

3.3.6 2 % agarózový gel pro elektroforetickou detekci DNA fragmentů

Byly naváženy 2 g agarózy a navážka byla převedena do Erlenmayerovy baňky. K tomuto množství bylo přidáno 100 ml 1x TBE pufru. Agaróza byla dokonale rozpuštěna opakovaným varem v mikrovlnné troubě.

3.3.7 Octanový pufr

Bylo naváženo 2,46 g octanu sodného. Navážka byla rozpuštěna v 7 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 5,5 přidávkem koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Roztok byl převeden do 10 ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Takto připravený pufr byl uchováván při teplotě 4 °C. [19]

3.3.8 PCR směs

Pro jeden vzorek byla připravena směs PCR komponent v objemech uvedených v tabulce:

Tabulka 1: Složení PCR směsi

Komponenta	Objem (μ l)
Sterilní voda	128,7
Pufr	15
dNTP mix	3
Primer ITS1	0,6
Primer ITS4	0,6

K výslednému objemu 147,9 μl směsi bylo přidáno 1,5 μl templátové DNA a 0,6 μl termostabilní Taq polymerázy. Pro negativní kontrolu bylo ke směsi namísto templátové DNA přidáno 1,5 μl sterilní vody.

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Izolace kultur kvasinek

Do Erlenmayerových baněk se 100 ml sterilní sladiny bylo odebráno 15 až 20 bobulí z různých částí hroznu. Připravené vzorky byly kultivovány deset dní při laboratorní teplotě.

Po ukončení kultivace bylo pipetováno 200 μl narostlých směsných kultur na Petriho misky s kultivačním médiem obsahujícím antibiotikum a kyselinu propionovou. Kultura byla rozetřena po celé ploše misky sterilní hokejkou. Takto připravené směsné kultury byly po dobu několika dní kultivovány v termostatu při teplotě 26 °C.

Ze získaných směsných kultur byly izolovány kultury čisté sedminásobným opakováním Kochovy zředovací metody a křížových roztěrů:

Pro jeden vzorek byly připraveny tři zkumavky se sterilní vodou, dvě z nich obsahující 10 ml a jedna obsahující 9 ml vody. Z Petriho misky s rozetřenou kulturou byla přenesena dvě očka do zkumavky s 10 ml sterilní vody. Obsah zkumavky byl poté krátce promíchán na vortexu. 50 μl této suspenze bylo pomocí mikropipety přeneseno do nové zkumavky s 10 ml sterilní vody. Obsah byl opět promíchán na vortexu. 1 ml vzniklé směsi byl přenesen do zkumavky s 9 ml sterilní vody, opět pomocí mikropipety. Po promíchání na vortexu bylo z této poslední zkumavky pipetováno 50 μl suspenze na Petriho misku s kultivačním médiem. Pomocí očkovací kličky byl proveden křížový roztěr a zaočkované misky byly inkubovány v termostatu při teplotě 26 °C po dobu tří až čtyř dní. Celý postup byl zopakován sedmkrát, tedy až do získání čistých kvasinkových kultur, které byly následně přeneseny na šikmé agary a uchovávány pod parafínovým olejem v ledničce.

V případě prvních tří ředění a roztěrů bylo využito kultivační médium s antibiotikem a kyselinou propionovou za účelem zabránění růstu bakterií a plísní.

3.4.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena využitím komerčního setu Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit podle příloženého návodu.

Do rozbíjecí zkumavky MicroBead tube bylo pipetováno 300 μl rozbíjecího pufru MicroBead Solution, ve kterém byla poté rozmíchána dvě očka kvasinkové kultury. Ke vzniklé směsi bylo přidáno 50 μl roztoku MD1. Rozbíjecí zkumavky byly v horizontální poloze vloženy do adaptéru vortexu a směs byla vortexována po dobu 10 minut při maximální rychlosti.

Po ukončení vortexování byl obsah zkumavek centrifugován při 10 000 otáčkách a teplotě 4 °C 1 minutu. Všechny následující centrifugace proběhly za stejných podmínek.

Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 100 µl roztoku MD2. Vzniklý roztok byl krátce zvortexován a inkubován 5 minut při teplotě 4 °C. Po inkubaci byl roztok opět centrifugován. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky a bylo k němu přidáno 900 µl roztoku MD3. Obsah zkumavky byl opět krátce zvortexován.

700 µl získané směsi bylo pipetováno na filtrační kolonku a následně centrifugováno. Filtrát byl odstraněn a na kolonku byl přidán zbytek směsi z předchozího kroku. Směs byla opět centrifugována a filtrát byl následně odstraněn.

Na kolonku se získanou DNA bylo pipetováno 300 µl roztoku MD4 a obsah kolonky byl centrifugován. Po odstranění přefiltrovaného roztoku byla centrifugace ještě jednou zopakována.

Po ukončení centrifugace byla kolonka přenesena do další čisté mikrozkušavky a na její membránu bylo pipetováno 50 µl roztoku MD5. Opět následovala centrifugace. Kolonka byla po jejím skončení odstraněna z mikrozkušavky a získaný roztok DNA byl uchováván při teplotě – 20 °C.

3.4.3 PCR

K PCR směsi o objemu 147,9 µl (viz kap. 3.3.8) bylo přidáno 1,5 µl templátové DNA a 0,6 µl Taq polymerázy. U negativní kontroly byla namísto templátové DNA využita sterilní voda. Směs byla krátce zvortexována a templátová DNA byla namnožena v termocykléru podle programu s tímto teplotním a časovým profilem:

Tabulka 2: Teplotní profil PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	
Počáteční denaturace	94	4	
Denaturace	25 cyklů	94	1
Připojení primerů		48	0,5
Polymerace		72	1
Elongace	72	10	

Pro amplifikaci oblasti 5,8S-ITS rDNA byly využity primery ITS1 a ITS4 s těmito sekvencemi:

Tabulka 3: Sekvence ITS primerů

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

3.4.4 Elektroforetická detekce PCR produktů

Detekce PCR produktů byla provedena využitím horizontální gelové elektroforézy na 2 % agarózovém gelu s přídavkem ethidium bromidu pro pozdější vizualizaci fragmentů. Ethidium bromid byl do gelu přidán tak, aby poměr jeho objemu a objemu gelu byl 1:10 000.

Velikost elektroforetické vany byla zvolena podle počtu vzorků. Pro malou vanu (14 jamek) bylo použito 40 ml gelu, pro střední vanu (20 jamek) 60 ml gelu a pro velkou vanu (50 jamek) 150 ml gelu.

Před nanášením na gel bylo vždy 5 µl vzorku smícháno s 1 µl nanášecího pufru a 5 µl takto vzniklého roztoku bylo pipetováno do jamky. Do obou krajních jamek gelu byly vždy naneseny 3 µl délkového standardu 100 bp.

Gel byl po ukončení elektroforézy umístěn do transluminátoru a vyfocen pod UV světlem pomocí programu Scion Image.

3.4.5 Podmínky elektroforézy

Podmínky elektroforézy byly vždy nastaveny podle velikosti použité vany:

- Pro **malou** vanu bylo použito konstantní napětí 45 V po dobu 2 hodin.
- Pro **střední** vanu bylo použito konstantní napětí 55 V po dobu 2 hodin.
- Pro **velkou** vanu bylo použito konstantní napětí 65 V po dobu 2,5 hodiny.

3.4.6 Přečištění PCR produktů

Přečištění PCR produktů je nutný krok před restrikční analýzou. K 20 µl PCR produktu (amplifikované DNA) byly přidány 2 µl octanového pufru. Roztok byl krátce zvortexován a bylo k němu dále přidáno 60 µl 96 % ethanolu vychlazeného na teplotu – 20 °C.

Směs byla centrifugována 30 minut při teplotě 4 °C a 14 000 otáčkách. Supernatant byl slit a k sedimentu ve zkumavce bylo pipetováno 60 µl 80 % ethanolu, opět vychlazeného na – 20 °C. Roztok byl opět centrifugován za stejných podmínek jako v předchozím kroku.

Po skončení centrifugace byl supernatant opět slit a zbytek ethanolu ve zkumavkách byl vysušen v exsikátoru po dobu 10 minut.

3.4.7 Restrikční analýza

K přečištěné DNA bylo přidáno 13,4 µl sterilní vody, 0,1 µl restrikční endonukleázy a 1,5 µl příslušného pufru. Tyto objemy byly zvoleny na základě doporučení výrobce v příbalových letáčích a zkušeností z minulých let.

Takto připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 37°C po dobu 16 hodin. Restrikční endonukleáza byla následně inaktivována zvýšením teploty po dobu 20 minut. Teploty inaktivace byly zvoleny podle použitého enzymu.

Tabulka 4: Teploty inkubace a inaktivace restrikčních enzymů

Enzym	Producent	Rozpoznávací místo	Teplota inkubace (°C)	Teplota inaktivace (°C)
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'...GG↓CC...3' 3'...CC↑GG...5'	37	80
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'...GCG↓C...3' 3'...C↑GCG...5'	37	65
<i>Hinfl</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'...G↓ANTC...3' 3'...CTNA↑G...5'	37	80
<i>Taq^I</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	5'...T↓CGA...3' 3'...AGC↑T...5'	37	80

3.4.8 Elektroforetická detekce restrikčních fragmentů

Restrikční fragmenty byly detekovány obdobným způsobem jako produkty PCR, tedy horizontální gelovou elektroforézou na 2 % agarózovém gelu. Velikost elektroforetické vany a příslušné množství gelu bylo opět zvoleno podle počtu vzorků (viz kap. 3.4.4.).

Před nanesením na gel bylo 5 µl vzorku smícháno s 1 µl nanášecího pufru, a 5 µl této směsi bylo pipetováno do jamky gelu. Stejným způsobem byl nanesen i vzorek pro pozitivní kontrolu, tedy neštěpený PCR produkt o délce shodné s délkou ampliconu použitého pro restrikční analýzu. Do obou krajních jamek gelu byly vždy naneseny 3 µl 100 bp délkového standardu. Po ukončení elektroforézy byl gel umístěn do transluminátoru a vyfocen pod UV světlem pomocí programu Scion Image.

3.4.9 Podmínky elektroforézy

- **Malá** vana: konstantní napětí 45 V po dobu 2,5 hodiny.
- **Střední** vana: konstantní napětí 55 V po dobu 2,5 hodiny.
- **Velká** vana: konstantní napětí 65 V po dobu 2,5 hodiny.

3.4.10 Zpracování výsledků v programu BioNumerics

Na základě UPGMA (unweighted pair-group average) shlukové analýzy byly v programu BioNumerics vytvořeny dendrogramy genetické podobnosti izolovaných kvasinek. Shluková analýza je metoda, která pracuje na principu rozdělení většího množství proměnných (dat) do tříd či shluků podle podobnosti určitých znaků. V našem případě se jednalo o délky označených fragmentů na fotografiích elektroforetických gelů.

Protože hodnocené znaky měly metrický charakter, byl při shlukové analýze využit koeficient podobnosti, konkrétně Jaccardův koeficient.

$$S_j = \frac{a}{a+b+c+d},$$

kde koeficienty a , b , c , d představují počty shodných znaků.

Metoda UPGMA, kterou program BioNumerics využívá k vyhodnocování genetické podobnosti, považuje za vzdálenost mezi dvěma shluky průměr vzdáleností mezi všemi páry objektů těchto shluků. Objekty, v našem případě taxony, které jsou si nejvíce podobné, mají mezi sebou nejkratší vzdálenost. Takto vzniká dendrogram, tedy grafické znázornění hierarchicky uspořádaných shluků. [23]

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této práce byla izolace a identifikace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* z povrchu bobulí vinné révy odrůd Malverina a Sauvignon.

4.1 Identifikace kvasinek izolovaných z bobulí odrůdy Malverina

4.1.1 Amplifikace DNA izolovaných kvasinek pomocí PCR

DNA izolovaných kvasinek byla amplifikována podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.3. Podle délky PCR produktů (viz také příloha 2, obr. 10) lze vzorky rozdělit do několika skupin. U vzorků č. 12, 14, 35 a 38 byla délka získaného fragmentu 430 párů bází (bp). V případě vzorků č. 3, 10, 16, 18, 21, 30, 32, a 40 byla délka tohoto fragmentu 800 bp. U vzorku č. 6 byla zjištěna délka PCR produktu 750 bp, v případě vzorku č. 28 640 bp a u vzorku č. 44 byla zjištěna délka fragmentu 680 bp. Délky všech získaných fragmentů jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Délky PCR produktů izolovaných kvasinek

Vzorek č.	PCR (bp)
3	800
6	750
10	800
12	430
14	430
16	800
18	800
21	800
28	640
30	800
32	800
35	430
38	430
40	800
44	680

4.1.2 Restrikční analýza

Amplifikovaná DNA byla přečištěna ethanolem, čímž byly odstraněny nadbytečné složky PCR směsi. Pro přesnější taxonomické zařazení byla provedena restrikční analýza s využitím čtyř restrikčních endonukleáz, a to *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI* a *TaqI*^a (viz příloha 2, obr. 11-14). Postup analýzy je uveden v kapitole 3.4.7.

4.1.2.1 Restrikční endonukleáza *HaeIII*

Restrikční enzym *HaeIII* má rozpoznávací místo pro sekvenci DNA 5'...GG↓CC...3'. Délky restrikčních fragmentů získaných použitím tohoto enzymu jsou shrnuty v tabulce 6. Z délek získaných restrikčních fragmentů je patrné, že ve skupině mající PCR produkt délky 430 bp byly vzorky č. 12 a 14 rozštěpeny na dva fragmenty o délkách 300 a 110 bp, a vzorky č. 35 a 38 byly rozštěpeny na tři fragmenty o délkách 300, 110 a 60 bp.

V případě vzorků, jejichž PCR produkt byl dlouhý 800 bp, nebyla DNA štěpena. Z ostatních vzorků nebyly č. 6 a 28 štěpeny a vzorek č. 44 byl rozštěpen na tři fragmenty délek 410, 230 a 70 bp.

Tabulka 6: Délky restrikčních fragmentů vzniklých štěpením endonukleázou *HaeIII*

HaeIII		
Vzorek č.	PCR (bp)	RF (bp)
3	800	n
6	750	n
10	800	n
12	430	300, 110
14	430	300, 110
16	800	n
18	800	n
21	800	n
28	650	n
30	800	n
32	800	n
35	430	300, 110, 60
38	430	300, 110, 60
40	800	n
44	680	410, 230, 70

4.1.2.2 Restrikční endonukleáza *HhaI*

Tato restrikční endonukleáza má rozpoznávací místo pro sekvenci 5'...GCG↓C...3'. Délky získaných restrikčních fragmentů jsou shrnuty v tabulce 7.

Vzorky č. 12 a 14 byly rozštěpeny na dva fragmenty o délce 230 a 110 bp, zatímco vzorky 35 a 38 byly rozštěpeny na tři fragmenty o délce 230, 110 a 70 bp. Ze skupiny mající PCR produkt délky 800 bp byly vzorky č. 3 a 10 rozštěpeny na dva fragmenty o shodné délce 340 bp, vzorky č. 16, 18, 21, 30, 32 a 40 byly rozštěpeny na tři fragmenty o délce 340, 130 a 80 bp.

Vzorek č. 6 byl rozštěpen na dva fragmenty o délce 340 a 70 bp, zatímco vzorek 28 byl rozštěpen na fragmenty dlouhé 200 a 80 bp a v případě vzorku č. 44 byly zjištěny fragmenty o délce 320, 240, 120 a 80 bp.

Tabulka 7: Délky restričních fragmentů vzniklých štěpením endonukleázou HhaI

HhaI		
Vzorek č.	PCR (bp)	RF (bp)
3	800	340, 340
6	750	340, 70
10	800	340, 340
12	430	230, 110
14	430	230, 110
16	800	340, 130, 80
18	800	340, 130, 80
21	800	340, 130, 80
28	650	200, 80
30	800	340, 130, 80
32	800	340, 130, 80
35	430	230, 110, 70
38	430	230, 110, 70
40	800	340, 130, 80
44	680	320, 240, 120, 80

4.1.2.3 Restriční endonukleáza HinfI

Tento enzym má rozpoznávací místo pro sekvenci 5'...G↓ANTC...3'. Délky získaných restričních fragmentů jsou shrnuty v tabulce 8.

Ze skupiny, jejíž původní DNA fragment měl délku 430 bp, byly vzorky 12, 35 a 38 rozštěpeny na dva fragmenty o délce 200 a 70 bp, zatímco u vzorku 14 byl nalezen pouze jeden fragment o délce 200 bp. V případě skupiny s původním fragmentem o délce 800 bp se všechny vzorky, s výjimkou č. 32, který byl rozštěpen na tři fragmenty o délce 340, 190 a 160, rozštěpily na čtyři fragmenty o délce 340, 180, 150 a 70 bp.

U vzorku č. 28 byly nalezeny tři fragmenty o délce 300, 190 a 140 bp a vzorek č. 44 byl štěpen také na tři fragmenty, tentokrát o délce 360, 220 a 70 bp.

Tabulka 8: Délky restrikčních fragmentů vzniklých štěpením endonukleázou HinfI

HinfI		
Vzorek č.	PCR (bp)	RF (bp)
3	800	340, 180, 150, 70
6	700	340, 190, 60
10	800	340, 180, 150, 70
12	430	200, 70
14	430	200
16	800	340, 180, 150, 70
18	800	340, 180, 150, 70
21	800	340, 180, 150, 70
28	650	300, 190, 140
30	800	340, 180, 150, 70
32	800	340, 190, 160
35	430	200, 70
38	430	200, 70
40	800	340, 180, 150, 70
44	680	360, 220, 70

4.1.2.4 Restrikční endonukleáza TaqI

Tento enzym má rozpoznávací místo pro sekvenci 5'...T↓CGA...3'. Délky získaných restrikčních fragmentů jsou shrnuty v tabulce 9.

Ze skupiny vzorků č. 12, 14, 35 a 38 byly všechny rozštěpeny na dva fragmenty o délce 290 a 170 bp.

Ze skupiny vzorků, jejichž původní fragment měl délku 800 bp byly všechny vzorky, s výjimkou č. 32, rozštěpeny na tři fragmenty o délce 430, 190 a 150 bp, zatímco vzorek č. 32 byl rozštěpen na čtyři fragmenty.

Vzorek č. 28 byl rozštěpen na dva fragmenty o délce 150 a 90 bp, zatímco u vzorku 44 byly nalezeny tři fragmenty o délce 270, 230 a 90 bp.

Tabulka 9: Délky restrikčních fragmentů vzniklých štěpením restrikční endonukleázou TaqI

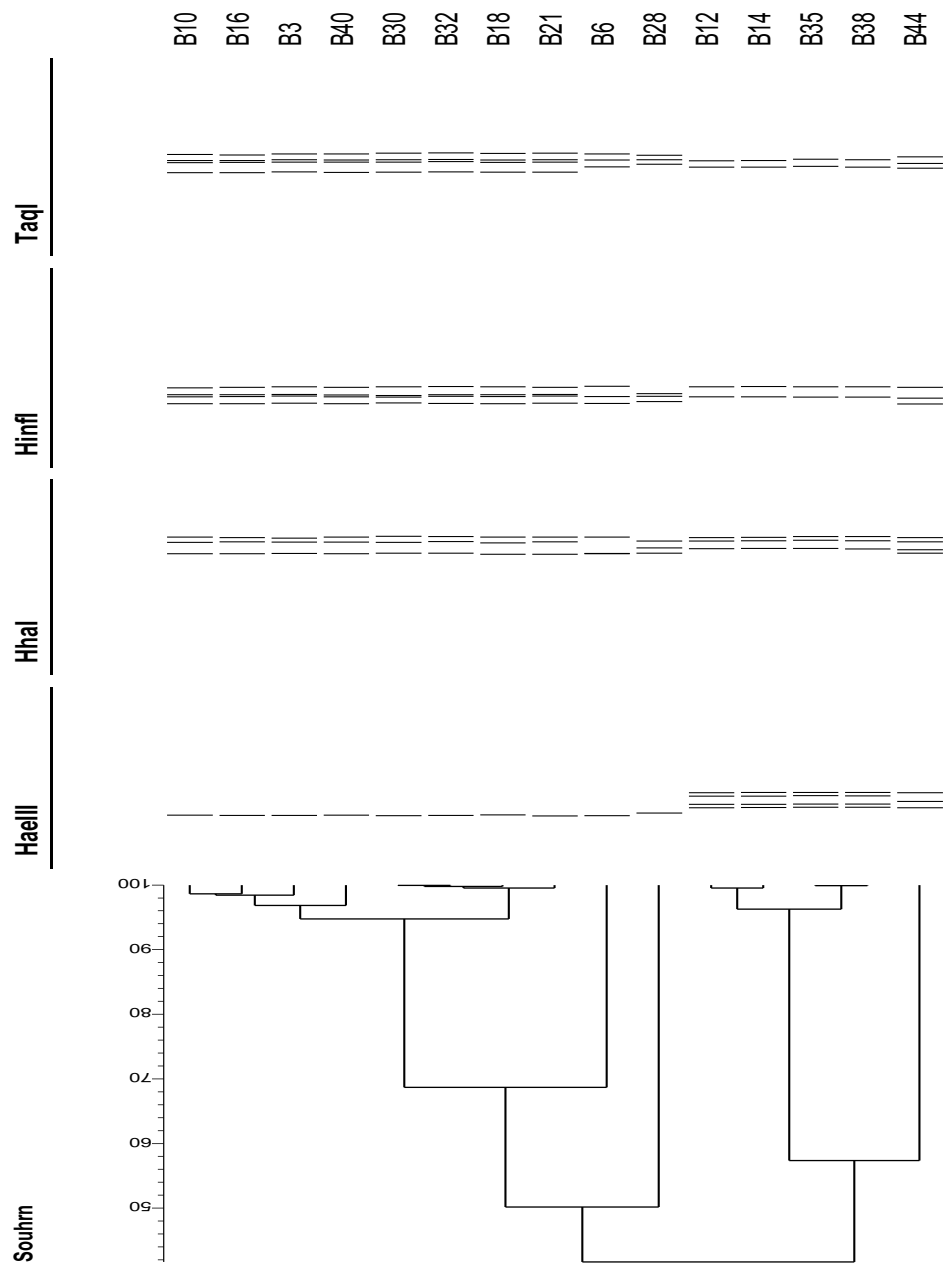
TaqI		
Vzorek č.	PCR (bp)	RF (bp)
3	800	430, 190, 150
6	700	290, 160, 80
10	800	430, 190, 150
12	430	290, 170
14	430	290, 170
16	800	430, 190, 150
18	800	430, 190, 150
21	800	430, 190, 150
28	640	150, 90
30	800	430, 190, 150
32	800	420, 180, 160, 80
35	430	290, 170
38	430	290, 170
40	800	430, 190, 150
44	680	270, 230, 90

4.1.3 Genetická podobnost izolovaných kvasinek

Všechny získané elektroforeogramy byly upraveny a zpracovány ve statistickém programu BioNumerics. Na základě UPGMA shlukové analýzy byla porovnána genetická podobnost analyzovaných kvasinek a byl vytvořen dendrogram – fylogenetický strom podle Jaccardova koeficientu s tolerancí 1 %.

Po restrikční analýze byly kvasinky rozlišeny na úrovni druhů. Z dendrogramu je patrné, že vzorky byly rozděleny do několika skupin. Vzorky č. 12 a 14 mají 100 % shodu u všech endonukleáz. Vzorek 38 má se dvěma předchozími 90 % shodu a v případě vzorku 35 se jedná o 85 % shodu. Porovnáním se články [26, 27] a fakultní databází lze usoudit, že se jedná o kvasinky rodu *Pichia*, přičemž vzorky 12 a 14 zastupují stejný druh a vzorky 38 a 35 zastupují dva další, odlišné druhy.

Vzorky č. 3, 10, 18, 40, 30, 32, 21 a 16 byly zařazeny ke druhu *Brettanomyces/Dekkera anomala*. Z dendrogramu je patrné, že vzorky č. 3 a 10 pravděpodobně patří ke stejnému kmeni, stejně jako vzorky 30 a 32. Vzorek 44 byl zařazen ke druhu *Rhodotorula graminis*, zatímco vzorek č. 6 byl zařazen k rodu *Hanseniaspora* a vzorek č. 28 ke druhu *Rhodotorula glutinis*. Z bobulí této odrůdy se nepodařilo izolovat kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, což mohlo být způsobeno kombinací povětrnostních podmínek těsně před odběrem vzorků, agrochemických zásahů na vinici a metod použitých pro zpracování vzorků.



Obrázek 6: Dendrogram genetiické podobnosti kvasinek izolovaných z odrůdy Malverina

4.2 Identifikace kvasinek izolovaných z bobulí odrůdy Sauvignon

4.2.1 Amplifikace DNA izolovaných kvasinek pomocí PCR

DNA izolovaných kvasinek byla amplifikována způsobem uvedeným v kapitole 3.4.3. I zde lze rozdělit izolované kvasinky do skupin podle délky jejich PCR produktu. (viz také příloha 2, obr. 10)

První skupinu tvoří vzorky č. 1, 19, 22 a 23, u nichž byl nalezen fragment o velikosti 800 bp. Do další, nejpočetnější skupiny byly zahrnuty vzorky č. 5, 9, 17, 20, 27, 33, 36, 42 a 47, jejichž PCR fragment měl délku 430 bp. U vzorků č. 7, 8 a 24 byl nalezen fragment o délce 520 bp, zatímco u vzorků č. 25 a 45 se jednalo o fragment délky 470 bp a PCR produkt vzorků 26 a 48 měl délku 570 bp. Délky všech získaných fragmentů jsou shrnuty v tabulce 10.

Tabulka 10: Délky PCR produktů izolovaných kvasinek

Vzorek č.	PCR (bp)
1	800
5	430
7	520
8	520
9	430
17	430
19	800
20	430
22	800
23	800
24	520
25	470
26	570
27	430
33	430
36	430
42	430
45	470
47	430
48	570

4.2.2 Restrikční analýza

Restrikční analýza izolovaných kvasinek byla provedena způsobem uvedeným v kapitole 3.4.7. Amplifikovaná DNA byla opět přečištěna ethanolem a pro restrikční analýzu byly využity restrikční endonukleázy HaeIII, HhaI, HinfI a TaqI. (viz příloha 2, obr. 11-14)

4.2.2.1 Restrikční endonukleáza *HaeIII*

Podle počtu a délky restrikčních fragmentů získaných použitím této endonukleázy lze vzorky dále dělit do více skupin. V případě vzorků, jejichž původní fragment měl délku 800 bp, tedy č. 1, 19, 22 a 23, byl rozštěpen pouze vzorek č. 1, a to na čtyři fragmenty o délkách 390, 290, 100 a 70 bp. Ve skupině, jejíž původní fragment měl délku 430 bp, byly všechny vzorky kromě č. 20 a 33 rozštěpeny na tři fragmenty o délkách 300, 110 a 60 bp.

Ze vzorků, jejichž PCR produkt měl délku 520 bp, byly č. 7 a 8 rozštěpeny na tři fragmenty o délce 400, 90 a 70 bp, zatímco vzorek č. 24 zůstal nerozštěpen. Všechny zbývající vzorky byly touto restrikční endonukleázou štěpeny. V případě vzorků 25 a 45 se jednalo o dva fragmenty délky 400 a 90 bp a u vzorků č. 26 a 48 šlo o tři fragmenty délky 400, 100 a 70 bp. Délky všech restrikčních fragmentů jsou shrnuty v tabulce 11.

Tabulka 11: Délky restrikčních fragmentů po štěpení endonukleázou *HaeIII*

HaeIII		
Vzorek č.	PCR (bp)	RF (bp)
1	800	390, 290, 100, 70
5	430	300, 110, 60
7	520	400, 90, 70
8	520	400, 90, 70
9	430	300, 110, 60
17	430	300, 110, 60
19	800	n
20	430	n
22	800	n
23	800	n
24	520	n
25	470	400, 90
26	570	400, 100, 70
27	430	300, 110, 70
33	430	n
36	430	300, 110, 60
42	430	300, 110, 60
45	470	400, 90
47	430	300, 110, 60
48	570	400, 100, 70

4.2.2.2 Restrikční endonukleáza *HhaI*

Vyhodnocením délek restrikčních fragmentů získaných použitím této i dalších dvou endonukleáz lze jednotlivé vzorky dále odlišit, nebo lze potvrdit, zda jsou některé vzorky shodné.

Ve skupině vzorků 1, 19, 22 a 23 je jasně patrné, že vzorek č. 1, rozštěpený na dva fragmenty o velikosti 400 a 70 bp, je od zbývajících vzorků v této skupině odlišný. Ve skupině, jejíž PCR produkt měl délku 430 bp byla většina vzorků kromě č. 20 a 33 rozštěpena na tři fragmenty o velikosti 220, 110 a 70 bp.

Dále je patrné, že vzorek č. 24, rozštěpený na tři fragmenty délek 230, 130 a 80 bp, je odlišný od vzorků č. 7 a 8, přestože jejich původní fragmenty měly stejnou délku. Vzorky č. 25 a 45 byly shodně rozštěpeny na tři fragmenty délek 180, 120 a 90 bp, zatímco vzorky č. 26 a 48 byly rozštěpeny na tři fragmenty délek 310, 280 a 70 bp.

Tabulka 12: Délky restrikčních fragmentů vzniklých použitím endonukleázy HhaI

HhaI		
Vzorek č.	PCR (bp)	RF (bp)
1	800	400, 70
5	430	220, 110
7	520	180, 110, 80
8	520	180, 110, 80
9	430	220, 110, 70
17	430	220, 110
19	800	340, 130, 80
20	430	220, 110
22	800	350, 130, 80
23	800	350, 130, 80
24	520	230, 130, 80
25	470	180, 120, 90
26	570	310, 280, 70
27	430	220, 110
33	430	210, 100
36	430	220, 110, 70
42	430	220, 110, 70
45	470	180, 120, 90
47	430	220, 110, 70
48	570	300, 280, 70

4.2.2.3 Restrikční endonukleáza HinfI

Z tabulky 13, shrnující délky restrikčních fragmentů získaných působením restrikční endonukleázy HinfI, je patrné, že fragmenty vzorku č. 1 (180 a 60 bp) a vzorku č. 23 (250 a 220 bp), byly odlišné od fragmentů u vzorků č. 19 a 22, které byly rozštěpeny na čtyři fragmenty délek 350, 190, 160 a 70 bp.

Ve skupině, jejíž původní fragment měl délku 430 bp byly všechny vzorky rozštěpeny na fragmenty o délkách 200 a 70 bp. Vzorky 7 a 8 byly opět rozštěpeny shodně, a to na tři

fragmenty délek 240, 210 a 60 bp, zatímco vzorek č. 24 byl opět odlišný. Ze zbývajících vzorků byly č. 25 a 45 štěpeny na dva fragmenty délek 250 a 210 bp, zatímco č. 26 a 48 byly rozštěpeny na fragmenty délek 260 a 70 bp.

Tabulka 13: Délky restrikčních fragmentů, vzniklých působením endonukleázy *HinfI*

HinfI		
Vzorek č.	PCR (bp)	RF (bp)
1	800	180, 60
5	430	200, 70
7	520	240, 210, 60
8	520	240, 210, 60
9	430	200, 70
17	430	200, 70
19	800	350, 190, 160, 70
20	430	200, 70
22	800	350, 190, 160, 70
23	800	250, 220
24	520	230
25	470	250, 210
26	570	260, 70
27	430	200, 70
33	430	200, 70
36	430	200, 70
42	430	200, 70
45	470	250, 210
47	430	200, 70
48	570	260, 70

4.2.2.4 Restrikční endonukleáza *TaqI*

Z délek restrikčních fragmentů, shrnutých v tabulce 14 lze usoudit, že v případě vzorků, jejichž původní fragment měl délku 800 bp, byl vzorek č. 1 opět rozštěpen na odlišné restrikční fragmenty než vzorky 19, 22 a 23.

V případě skupiny s původním fragmentem délky 430 bp byly všechny vzorky rozštěpeny na tři fragmenty délky 280, 160 a 80 bp. Fragmenty vzorku č. 24 byly opět odlišné od fragmentů vzorků č. 7 a 8, zatímco vzorky č. 25 a 45 byly štěpeny na tři fragmenty délek 190, 140 a 100 bp, a vzorky č. 26 a 48 byly štěpeny na fragmenty délek 300, 230 a 80 bp.

Tabulka 14: Délky restrikčních fragmentů vzniklých použitím endonukleázy TaqI

TaqI		
Vzorek č.	PCR (bp)	RF (bp)
1	800	270, 140, 70
5	430	280, 160, 80
7	520	180, 150, 100
8	520	180, 150, 100
9	430	280, 160, 80
17	430	280, 160, 80
19	800	430, 190, 150
20	430	280, 160, 80
22	800	430, 190, 150
23	800	430, 190, 150
24	520	310, 120
25	470	190, 140, 100
26	570	300, 230, 80
27	430	280, 160, 80
33	430	280, 150, 80
36	430	280, 160, 80
42	430	280, 160, 80
45	470	190, 140, 100
47	430	280, 160, 80
48	570	300, 230, 80

4.2.3 Genetická podobnost izolovaných kvasinek

Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu BioNumerics způsobem uvedeným v kapitole 4.1.3. Kvasinky byly opět rozlišeny na úrovni druhů a z dendrogramu je opět patrné rozdělení vzorků do skupin.

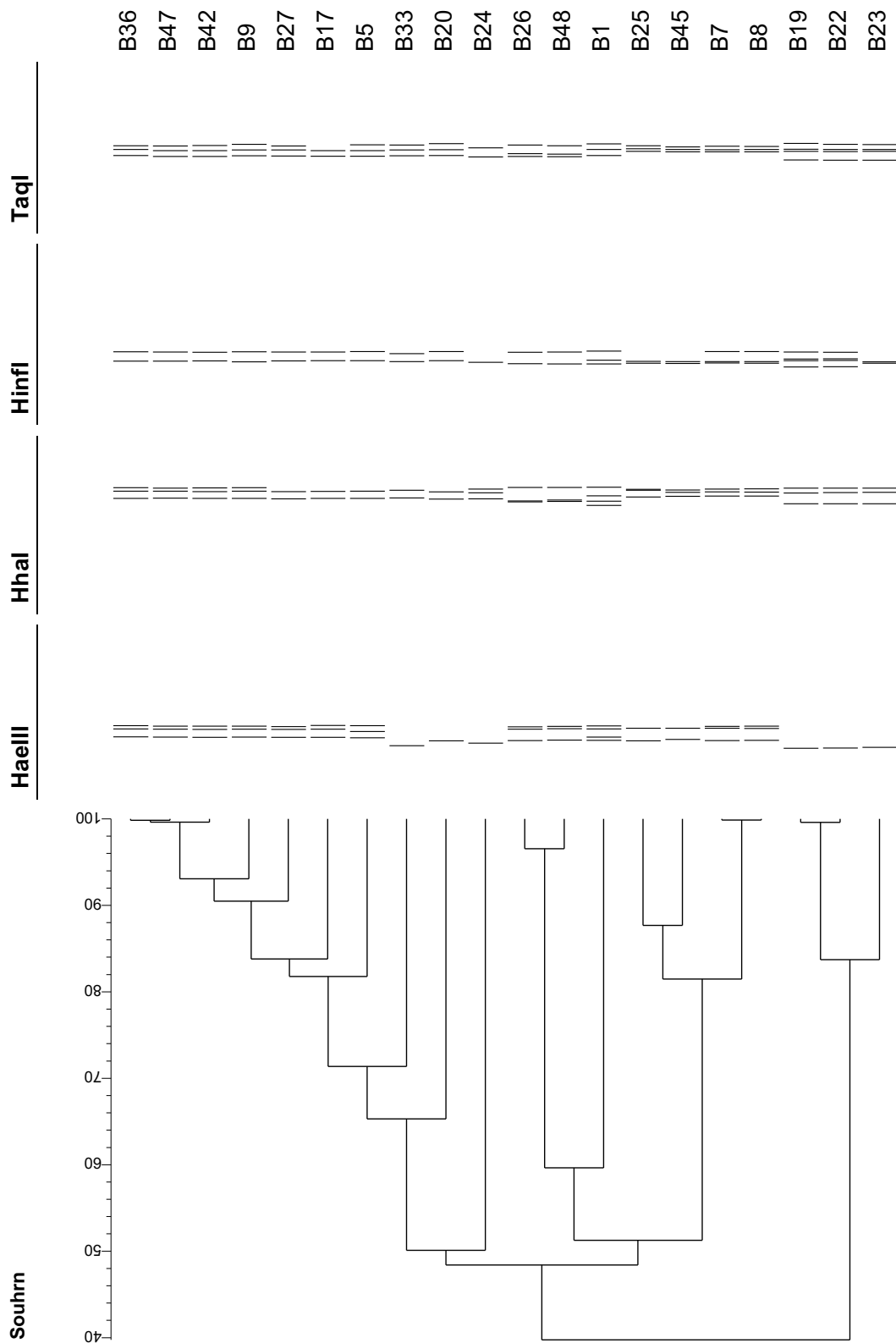
Vzorky č. 19, 22 a 23 byly identifikovány jako druh *Brettanomyces/Dekkera anomala* a zařazeny do oddělené skupiny. Vzorky č. 19 a 22 mají téměř 100 % shodu, jedná se tedy nejspíše i o stejný kmen, zatímco vzorek č. 23 je se dvěma předchozími shodný v 85 % a jedná se pouze o stejný druh.

Vzorky č. 7 a 8 jsou shodné a byly zařazeny do rodu *Pichia*. Vzorky č. 25 a 45 jsou shodné z 90 % a byly identifikovány jako *Pichia kluyveri*. Další dvojicí vzorků, patřící k rodu *Pichia*, jsou č. 25 a 45, shodné z 95 %.

Další velkou skupinu patřící k rodu *Pichia* tvoří vzorky, jejichž původní PCR produkt měl délku 430 bp. Z dendrogramu je patrné, že vzorky 36, 42 a 47 mají 100 % shodu a patří tedy ke stejnému druhu. V případě vzorků č. 5, 9, 17, 20, 27 a 33, jejichž vzájemná shoda se

pohybuje mezi 70 a 90 %, se pravděpodobně jedná o různé druhy kvasinek rodu *Pichia*. Vzorek č. 24 byl také zařazen k rodu *Pichia*, zatímco vzorek č. 1 nebyl identifikován.

Kvasinka *Sachcharomyces cerevisiae* opět nebyla z povrchu bobulí této odrůdy izolována. I v tomto případě je nejpravděpodobnějším důvodem neúspěchu kombinace povětrnostních podmínek těsně před odběrem vzorků, agrochemických zásahů na vinici a metod použitých pro zpracování vzorků.



Obrázek 7: Dendrogram genetické podobnosti kvasinek izolovaných z odrůdy Sauvignon

5 ZÁVĚR

Teoretická část této práce má tři hlavní části. První z nich se zabývá odrůdami použitými pro experimentální část a technologií výroby vína. V následující části práce popisuje kvasinky a jejich morfologii, cytologii a metabolické procesy, obzvláště glykolýzu a alkoholové kvašení, a stručně popisuje některé rody kvasinek, vyskytujících se ve víně a kvašených nápojích. Poslední sekce teoretické části se zabývá analytickými metodami použitými v experimentální části této práce.

Hrozny použité v experimentální části této práce byly odebrány na vinici soukromého vinaře v okolí obce Milotice v okrese Hodonín dne 23. 9. 2015. Pomocí RFLP-PCR analýzy kvasinek odebraných z povrchu bobulí odrůdy Malverina bylo zjištěno, že izolované kvasinky náležely k rodům *Pichia*, *Brettanomyces*, *Rhodotorula* a *Hanseniaspora*. Mezi izolovanými kulturami byly dominantní kvasinky rodu *Brettanomyces*. Žádná z kultur nenáležela k rodu *Saccharomyces*. Celkem bylo z této odrůdy izolováno sedm různých kultur kvasinek.

V případě odrůdy Sauvignon bylo zjištěno, že kvasinky rodu *Pichia* byly dominantní. Několik vzorků bylo zařazeno k rodu *Brettanomyces* a jeden vzorek nebyl identifikován. Žádná z kultur nenáležela k rodu *Saccharomyces*. Celkem bylo izolováno deset různých kultur kvasinek.

Kvasinky rodu *Saccharomyces*, a obzvláště druh *Saccharomyces cerevisiae*, se ve srovnání s jinými rody na povrchu hroznů vinné révy vyskytují pouze ve velmi nízkých koncentracích. Tato nízká koncentrace buněk, povětrnostní podmínky těsně před odběrem vzorků a agrochemické zásahy na vinici jsou možné důvody, proč nebyly kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* z povrchu bobulí izolovány. Pokud tyto kvasinky na povrchu bobulí přítomny byly, mohlo během růstu směsných kultur v tekutém médiu (viz kap. 3.4.1) dojít k prosazení jiných, dominantnějších druhů, protože sladidové médium je na rozdíl od moštu velmi příznivým prostředím i pro divoké kvasinky, které se na povrchu bobulí révy vinné vyskytují ve výrazně vyšších koncentracích než druh *Saccharomyces cerevisiae*.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1]. RICHTER, Miloslav. *Velký atlas odrůd ovoce a révy*. Vyd. 1. Lanškroun: TG TISK, c2002. ISBN 80-238-9461-7.
- [2]. KRAUS, Vilém, Vítězslav HUBÁČEK a Petr ACKERMANN. *Rukověť vinaře*. 3. vyd. Praha: Brázda, 2010. ISBN 978-80-209-0378-5.
- [3]. FIC, Vlastimil. *Víno: analýza, technologie, gastronomie*. 1. vydání. Český Těšín: 2 THETA, 2015. ISBN 978-80-86380-77-3.
- [4]. ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [5]. WALKER, John M, Michael COX a Allan WHITAKER. *The language of biotechnology: a dictionary of terms*. 2nd ed. Washington, DC: American Chemical Society, 1995. ISBN 08-412-2982-1.
- [6]. ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2003. ISBN 80-7183-268-5.
- [7]. STEIDL, Robert a Georg LEINDL. *Cesta ke špičkovému vínu*. 1. vyd. Valtice: Národní salon vín, 2004. ISBN 80-903-2014-7.
- [8]. STEIDL, Robert. *Sklepní hospodářství. V českém jazyce vyd. 2., aktualiz. Překlad Jiří Sedlo*. Valtice: Národní vinařské centrum, 2010. ISBN 978-80-903201-9-2.
- [9]. KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [10]. KUTTELVAŠER, Zdeněk. *Abeceda vína*. Vyd. 1. Praha: Radix, 2003. ISBN 80-860-3143-8.
- [11]. ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [12]. BATT, Carl A a Mary Lou TORTORELLO (eds.). *Encyclopedia of food microbiology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-384730-0.
- [13]. SINGLETON, Paul. *Dictionary of DNA and genome technology*. 2nd ed. Chichester [u.a.]: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 978-0-470-74731-5.
- [14]. HUI, Y (ed.). *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2012. ISBN 978-1-4398-4904-0.

- [15]. BECKNER WHITENER, Margaret E., Silvia CARLIN, Dan JACOBSON, Deborah WEIGHILL, Benoit DIVOL, Lorenza CONTERNO, Maret DU TOIT a Urska VRHOVSEK. Early fermentation volatile metabolite profile of non-Saccharomyces yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, **64**(1), 412-422. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.05.018. ISSN 00236438. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643815003679>
- [16]. WALKER, Graeme M. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester: John Wiley, 1998. ISBN 04-719-6447-6.
- [17]. VILLALBA, María Leticia, Julieta SUSANA SÁEZ, Silvana DEL MONACO, Christian Ariel LOPES a Marcela Paula SANGORRÍN. TdKT, a new killer toxin produced by *Torulasporea delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, **217**, 94-100. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.006. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515301392>
- [18]. VESELÁ, Mária a Milan DRDÁK. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. přepr. vyd. Brno: VUT v Brně, 1999. ISBN 80-214-1305-0.
- [19]. ŠURANSKÁ, H. Identifikace vinných kvasinek metodou PCR-RFLP. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 100 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- [20]. MICHLOVSKÝ, Miloš. *Příprava bílých vín*. Vyd. 1. Rakvice: Vinselekt Michlovský, 2014. ISBN 978-80-905319-4-9.
- [21]. CONSIDINE, J a Elizabeth FRANKISH. *A complete guide to quality in small-scale wine making*. 1st pub. Oxford: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-408081-2.
- [22]. BURG, Patrik a Pavel ZEMÁNEK. *Technika pro vinařství*. 1. vyd. V Brně: Mendelova univerzita, 2013. ISBN 978-80-7375-910-0.
- [23]. HODEK, J., OVESNÁ, J. Detekce vnitřního genu rýže fosfolipázy D pomocí PCR. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2007, 16 l. ISBN 978-80-87011-35-5.
- [24]. Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F. and Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- [25]. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasinek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Bratislava: Vydavateľstvo Alfa, 1990. Edícia potravinárskej literatúry. ISBN 80-050-0644-6.

[26]. 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, **90**(2), 171-181. DOI: 10.1007/s10482-006-9071-0. ISSN 0003-6072. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-006-9071-0>.

[27]. BOEKHOUT, T. a V. ROBERT. *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*. Boca Raton: CRC Press, 2003. ISBN 08-493-1926-9.

[28]. ŠIPIČKÝ, Matej a Július ŠUBÍK. *Genetika kvasiniek: Vysokoškolská učebnica pre posl. biológie,..* Bratislava: Veda, 1992. ISBN 80-224-0396-2.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY PRO OBRÁZKY

[1] Metabolizmus sacharidov. In: *Www.oskole.sk* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: http://www.oskole.sk/userfiles/image/Zofia/M%C3%A1j/Ch%C3%A9mia/Metabolizmus%20sacharidov_html_690413c0.png

[2] 4220.png. In: *Web2.mendelu.cz* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/37/4220.png

[3] Nápoje - Střední odborné učiliště Domažlice. In: *M.soudom.cz* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://m.soudom.cz/napoje.html>

[4] Malverina. In: *Trhvin.cz* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: <http://www.trhvin.cz/pruvodce-vinem/10-malverina>

[5] Eukaryotická buňka kvasinky. In: *Vydavatelstvi.vscht.cz* [online]. [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_es-006/hesla/img__d10e3903.html

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- DNA: Deoxyribonukleová kyselina
- PCR: Polymerázová řetězová reakce
- EDTA: Ethylendiamintetraoctová kyselina
- TBE: Trisborát EDTA pufr
- EtBr: Ethidium bromid
- bp: počet párů bází
- V: volt (jednotka elektrického napětí)
- RF: restriční fragment
- RFLP: délkový polymorfismus restričních fragmentů
- UV: ultrafialové záření
- UPGMA: unweighted pair-group average shluková analýza

9 PŘÍLOHY

9.1 Příloha 1: Fotodokumentace odběru vzorků



Obrázek 8: Odběr vzorku z vinice

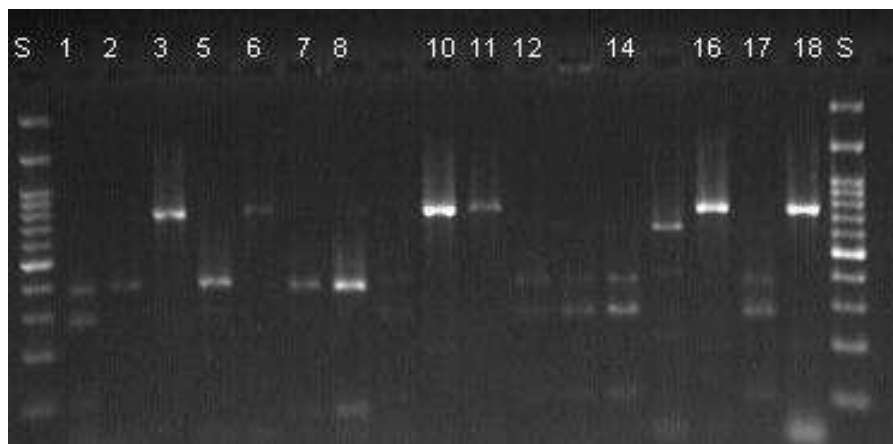


Obrázek 9: Odebraný vzorek

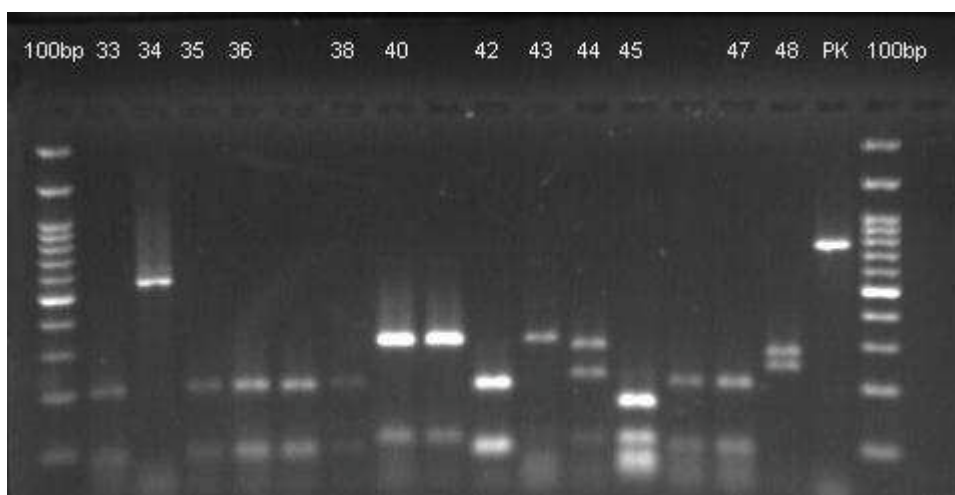
9.2 Příloha 2: Ukázky elektroforeogramů



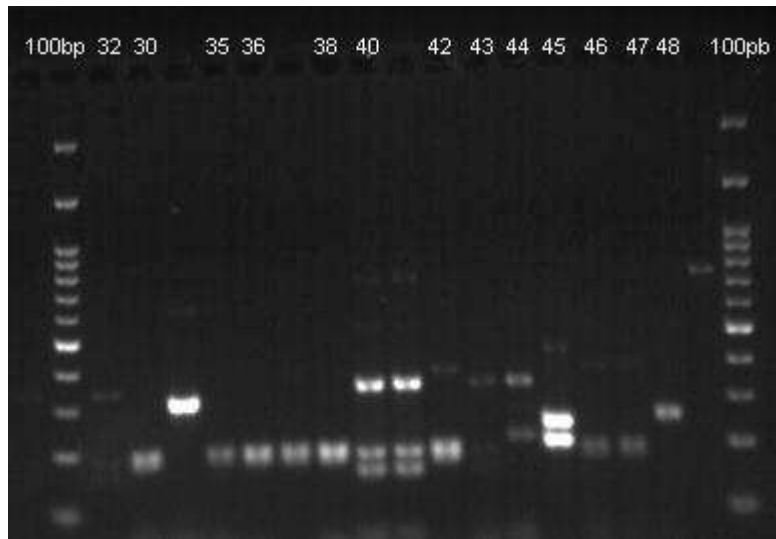
Obrázek 10: Ukázka elektroforeogramu PCR produktů: 100bp = délkový standard, NK = negativní kontrola. Vzorky v neoznačených běžích nebyly součástí této práce:



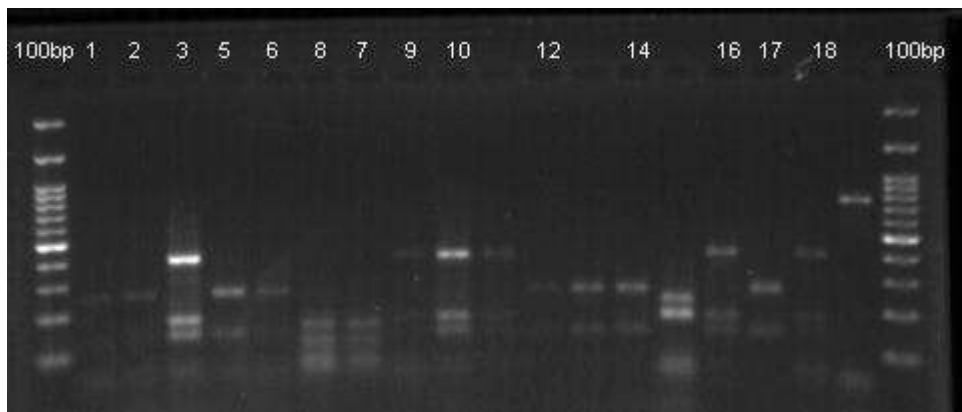
Obrázek 11: Ukázka elektroforeogramu po restrikční analýze s využitím endonukleázy *HaeIII*. S = délkový standard 100 bp, vzorky v neoznačených běžích nebyly součástí této práce



Obrázek 12: Ukázka elektroforeogramu po restrikční analýze s využitím endonukleázy *HhaI*. Vzorky v neoznačených běžích nebyly součástí této práce.



Obrázek 13: Ukázka elektroforeogramu po restrikční analýze s použitím endonukleázy *HinfI*. Vzorky v neoznačených běžích nebyly součástí této práce.



Obrázek 114: Ukázka elektroforeogramu po restrikční analýze s použitím endonukleázy *TaqI*