

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina LUKAN

**KLASIČNE IN SODOBNE METODE DOLOČANJA ŠTEVILA KVASOVK VRST  
*Saccharomyces cerevisiae* IN *Dekkera bruxellensis* V REALNIH VZORCIH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**TRADITIONAL AND RECENT TECHNIQUES FOR ENUMERATION OF YEASTS  
SPECIES *Saccharomyces cerevisiae* AND *Dekkera bruxellensis* IN REAL SAMPLES**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Peter Raspor, za somentorico doc. dr. Neža Čadež in za recenzentko prof. dr. Nina Gunde Cimerman.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik:     prof. dr. Romana Marinšek Logar  
                    Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- Član:             prof. dr. Peter Raspor  
                    Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Član:             doc. dr. Neža Čadež  
                    Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Član:             prof. dr. Nina Gunde Cimerman  
                    Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Tina Lukan

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| DK | UDK 579.24/.26.083+577.2.083:582.282.23:579.67(043)=163.6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| KG | kvasovke/vinske kvasovke/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Dekkera bruxellensis</i> /določanje števila kvasovk/štetje kvasovk/moš/vino/klasične metode/molekularne tehnike/PCR v realnem času/izolacija DNK kvasovk                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| AV | LUKAN, Tina                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| SA | RASPOR, Peter (mentor)/ČADEŽ, Neža (somentorica)/GUNDE CIMERMAN, Nina (recenzentka)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| KZ | SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| LI | 2012                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| IN | KLASIČNE IN SODOBNE METODE DOLOČANJA ŠTEVILA KVASOVK VRST <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IN <i>Dekkera bruxellensis</i> V REALNIH VZORCIH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| OP | XII, 54 str., 20 sl., 3 pril., 50 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| AI | Kvasovke imajo v kompleksnem procesu proizvodnje vina pomembno vlogo. Zato je število vodilne kvasovke pretvorbe grozdnega soka v vino in hkrati kvarljivko vina <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , in število kvarljivke <i>Dekkera bruxellensis</i> , pomembno določati v vseh stopnjah pridelave vina. Klasične metode določanja števila kvasovk so dolgotrajne in nespecifične. Cilj naloge je vpeljava metode PCR v realnem času za določanje števila kvasovk <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. bruxellensis</i> v realnih vzorcih. Vpeljava metode je vključevala izbiro najustreznejše metode izolacije DNK kvasovk neposredno iz mošta/vina, izbor oligonukleotidnih začetnikov ter optimizacijo njihove koncentracije in izdelavo umeritvene krivulje. Metodo smo nato preizkusili na vzorcih vina z izkazano senzorično napako in na fermentirajočem moštu. Kot najbolj učinkovita metoda izolacije DNK se je izkazala metoda s komercialnim kitom MasterPure. Za izdelavo umeritvene krivulje smo izbrali oligonukleotidne začetnike ScerF/ScerR za določanje <i>S. cerevisiae</i> , in Brett1/Brett2 za določanje <i>D. bruxellensis</i> , v koncentraciji 45 nM. Izdelane umeritvene krivulje niso zadoščale kriterijem učinkovitosti, zato tudi določanje števila v realnih vzorcih ni bilo točno. Kljub temu naši rezultati nakazujejo, da je metoda za določanje števila kvasovk s PCR v realnem času v primerjavi s klasičnimi metodami hitrejša, bolj učinkovita in bolj specifična. |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 579.24/.26.083+577.2.083:582.282.23:579.67(043)=163.6  
CX yeasts/wine yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/*Dekkera bruxellensis*/yeasts enumeration/yeast counting/musts/wines/traditional methods/molecular techniques/real-time PCR/yeast DNA isolation  
AU LUKAN, Tina  
AA RASPOR, Peter (supervisor)/ČADEŽ, Neža (co-advisor)/GUNDE CIMERMAN, Nina (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2012  
TI TRADITIONAL AND RECENT TECHNIQUES FOR ENUMERATION OF YEASTS SPECIES *Saccharomyces cerevisiae* AND *Dekkera bruxellensis* IN REAL SAMPLES  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XII, 54 p., 20 fig., 3 ann., 50 ref.  
LA Sl  
AL sl/en  
AB Yeasts play an important role in the complex process of winemaking. For this reason enumeration of main fermentation as well as spoilage yeast *Saccharomyces cerevisiae* and spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* respectively, at every stage of wine production is important. Traditional methods of enumeration are time-consuming and non-specific. The aim of this study was to introduce a Real Time PCR method for enumeration of *S. cerevisiae* and *D. bruxellensis* in samples. Implementation included the selection of the most appropriate method for DNA isolation, selection of primers and optimisation of their concentration and establishment of standard curve. The method was tested on samples of wine with off-flavours and fermenting must. Most efficient DNA isolation was achieved with commercial kit MasterPure. Primers ScerF/ScerR, specific to *S. cerevisiae*, and Brett1/Brett2, specific to *D. bruxellensis*, in concentration of 45 nM, were selected for the establishment of standard curve. Efficiencies of established standard curves weren't sufficient, consequently the enumeration wasn't accurate. However, our result suggest that Real Time PCR is a faster, more efficient and more specific than traditional methods of enumeration.

## KAZALO VSEBINE

|                                                        | Str.        |
|--------------------------------------------------------|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....</b> | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>              | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE .....</b>                            | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>                         | <b>VIII</b> |
| <b>KAZALO SLIK .....</b>                               | <b>IX</b>   |
| <b>KAZALO PRILOG .....</b>                             | <b>XI</b>   |
| <b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>                      | <b>XII</b>  |
| <b>SLOVARČEK.....</b>                                  | <b>XII</b>  |
| <br>                                                   |             |
| <b>1 UVOD .....</b>                                    | <b>1</b>    |
| 1.1 CILJ EKSPERIMENTALNE NALOGE .....                  | 1           |
| 1.2 DELOVNA HIPOTEZA .....                             | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                           | <b>3</b>    |
| 2.1 KVASOVKE .....                                     | 3           |
| 2.1.1 Vinske kvasovke.....                             | 3           |
| 2.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....            | 3           |
| 2.1.3 <i>Dekkera bruxellensis</i> .....                | 4           |
| 2.1.4 Kvar vina s kvasovkami .....                     | 4           |
| 2.2 FERMENTACIJA .....                                 | 5           |
| 2.2.1 Fermentacija vina .....                          | 5           |
| 2.2.2 Dinamika kvasovk med fermentacijo vina .....     | 5           |
| 2.3 KLASIČNE METODE DOLOČANJA ŠTEVILA KVASOVK .....    | 6           |
| 2.3.1 Neposredno štetje z mikroskopiranjem .....       | 6           |
| 2.3.2 Štetje z gojenjem na trdnem gojišču .....        | 6           |
| 2.3.3 Štetje z membransko filtracijo .....             | 7           |
| 2.4 SODOBNE METODE DOLOČANJA ŠTEVILA KVASOVK .....     | 7           |
| 2.4.1 Verižna reakcija s polimerazo .....              | 7           |
| 2.4.2 PCR v realnem času .....                         | 8           |
| 2.4.3 Kvantitativni PCR v realnem času .....           | 9           |

|         |                                                                                                                                        |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.4   | <b>Določanje števila kvasovk <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. bruxellensis</i> s PCR v realnem času</b>                                   | 11 |
| 3       | <b>MATERIAL IN METODE</b>                                                                                                              | 13 |
| 3.1     | <b>MATERIALI</b>                                                                                                                       | 14 |
| 3.1.1   | <b>Sevi mikroorganizmov</b>                                                                                                            | 14 |
| 3.1.2   | <b>Vzorci</b>                                                                                                                          | 14 |
| 3.1.3   | <b>Mikrobiološka gojišča</b>                                                                                                           | 14 |
| 3.1.4   | <b>Pufri in raztopine</b>                                                                                                              | 15 |
| 3.1.5   | <b>Komercialni kompleti</b>                                                                                                            | 16 |
| 3.1.6   | <b>Nukleotidi in encimi</b>                                                                                                            | 16 |
| 3.1.7   | <b>Druge spojine</b>                                                                                                                   | 17 |
| 3.1.8   | <b>Oprema</b>                                                                                                                          | 17 |
| 3.2     | <b>METODE</b>                                                                                                                          | 18 |
| 3.2.1   | <b>Izbira najprimernejše tehnike izolacije DNK</b>                                                                                     | 18 |
| 3.2.1.1 | Izolacija DNK s peskom (Möller in sod., 1992)                                                                                          | 18 |
| 3.2.1.2 | Izolacija DNK s komercialnim kompletom PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, 2007)                                                   | 19 |
| 3.2.1.3 | Izolacija DNK s komercialnim kompletom MasterPure® Yeast DNA Purification Kit (Jin in sod., 2004)                                      | 20 |
| 3.2.1.4 | Izolacija DNK s komercialnim kompletom DNA Isolation Kit for Cells and Tissues® (Roche, 2010)                                          | 20 |
| 3.2.1.5 | Izolacija DNK s komercialnim kompletom DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, 2006)                                                       | 20 |
| 3.2.2   | <b>Postavitev metode za določanje števila kvasovk vrst <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. bruxellensis</i> z uporabo PCR v realnem času</b> | 21 |
| 3.2.2.1 | Namnožitev kulture ter posredno in neposredno določanje koncentracije mikroorganizmov                                                  | 21 |
| 3.2.2.1 | Klasični PCR in izbira oligonukleotidnih začetnikov                                                                                    | 22 |
| 3.2.2.2 | Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov                                                                                | 23 |
| 3.2.2.3 | Izdelava umeritvene krivulje za določanje števila <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>Dekkera bruxellensis</i>                       | 24 |
| 3.2.3   | <b>Določanje števila kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>Dekkera bruxellensis</i> v vzorcih mošta</b>                        | 26 |
| 3.2.3.1 | Določanje števila <i>S. cerevisiae</i> v vzorcih mošta                                                                                 | 26 |
| 3.2.3.2 | Določanje števila <i>D. bruxellensis</i> v vzorcih mošta                                                                               | 27 |
| 3.2.3.3 | Določanje koncentracije DNK z aparaturo NanoDrop 1000                                                                                  | 27 |

|          |                                                                                                                      |    |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.4    | <b>Določanje števila kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>Dekkera bruxellensis</i> v vzorcih vina .....</b> | 27 |
| <b>4</b> | <b>REZULTATI.....</b>                                                                                                | 28 |
| 4.1      | IZBIRA NAJPRIMERNEJŠE TEHNIKE IZOLACIJE DNK.....                                                                     | 28 |
| 4.2      | POSTAVITEV METODE ZA DOLOČANJE ŠTEVILA KVASOVK Z UPORABO PCR V REALNEM ČASU .....                                    | 29 |
| 4.2.1    | Namnožitev kulture in določanje koncentracije mikroorganizmov .....                                                  | 29 |
| 4.2.2    | Klasični PCR in izbira oligonukleotidnih začetnikov .....                                                            | 31 |
| 4.2.3    | Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov .....                                                        | 32 |
| 4.2.4    | Izdelava umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk <i>S. cerevisiae</i> .....                                 | 35 |
| 4.2.5    | Izdelava umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk <i>D. bruxellensis</i> .....                               | 37 |
| 4.3      | DOLOČANJE ŠTEVILA KVASOVK V REALNIH VZORCIH .....                                                                    | 38 |
| 4.3.1    | Določanje števila kvasovk v vzorcih mošta .....                                                                      | 38 |
| 4.3.2    | Določanje števila kvasovk v vzorcih vina .....                                                                       | 41 |
| <b>5</b> | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>                                                                                       | 42 |
| 5.1.1    | Izbira najprimernejše tehnike izolacije DNK.....                                                                     | 42 |
| 5.1.2    | Namnožitev kulture in določanje koncentracije mikroorganizmov .....                                                  | 42 |
| 5.1.3    | Klasični PCR in izbira oligonukleotidnih začetnikov .....                                                            | 43 |
| 5.1.4    | Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov .....                                                        | 43 |
| 5.1.5    | Izdelava umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk.....                                                       | 45 |
| 5.1.6    | Določanje števila kvasovk v realnih vzorcih .....                                                                    | 46 |
| 5.2      | SKLEPI.....                                                                                                          | 48 |
| <b>6</b> | <b>POVZETEK.....</b>                                                                                                 | 49 |
| <b>7</b> | <b>VIRI .....</b>                                                                                                    | 50 |
|          | <b>ZAHVALA</b>                                                                                                       |    |
|          | <b>PRILOGE</b>                                                                                                       |    |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                                                     | str. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Uporabljeni sevi mikroorganizmov .....                                                                                                                                               | 14   |
| Preglednica 2: Komercialni kompleti za izolacijo DNK in izvedbo PCR v realnem času..                                                                                                                | 16   |
| Preglednica 3: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki .....                                                                                                                                         | 16   |
| Preglednica 4: Laboratorijska oprema .....                                                                                                                                                          | 17   |
| Preglednica 5: Kombinacije končnih koncentracij parov oligonukleotidnih začetnikov za pripravo reakcijske mešanice za izvedbo optimizacije koncentracije oligonukleotidnih začetnikov .....         | 24   |
| Preglednica 6: Rezultati določanja števila kvasovk v tekočem gojišču YPD z neposrednim štetjem pod mikroskopom .....                                                                                | 29   |
| Preglednica 7: Rezultati nacepivitve redčitev kvasovk na trdno gojišče WL agar in določanje CFU/mL .....                                                                                            | 30   |
| Preglednica 8: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov Brett1 in Brett2 .....                                                                                                           | 34   |
| Preglednica 9: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov Scer F in Scer R .....                                                                                                           | 34   |
| Preglednica 10: Karakteristike umeritvene krivulje za določanje števila <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; sev: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1027 ..... | 35   |
| Preglednica 11: Karakteristike umeritvene krivulje za določanje števila <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; sev: <i>S. cerevisiae</i> EC-1118 .....             | 36   |
| Preglednica 12: Karakteristike umeritvene krivulje za določanje števila <i>Dekkera bruxellensis</i> ; začetni oligonukleotidi: Brett1/Brett2; sev: <i>D. bruxellensis</i> ZIM 701 .....             | 37   |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                                                                | str. |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Prikaz idealne krivulje intenzivnosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov PCR v realnem času (Mackay, 2004). ....                                                                                                             | 9    |
| Slika 2: Hodogram aktivnosti poskusa .....                                                                                                                                                                                                     | 13   |
| Slika 3: Števna ploščica po Bürker-Türku z dimenzijami za neposredno določanje števila kvasovk pod mikroskopom (Brand GmbH+Co.KG, 2010).....                                                                                                   | 22   |
| Slika 4: Program PCR v realnem času za pomnoževanje DNK <i>S. cerevisiae</i> z začetniki ScerF in ScerR (Hiero in sod., 2007) .....                                                                                                            | 25   |
| Slika 5: Program PCR v realnem času za pomnoževanje DNK <i>D. bruxellensis</i> z začetniki Brett1 in Brett2 (Tessonnière in sod., 2009) .....                                                                                                  | 26   |
| Slika 6: Preverjanje uspešnosti izolacije DNK kvasovk z uporabo agarozne gelske elektroforeze. ....                                                                                                                                            | 28   |
| Slika 7: Kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1972 redčitev $10^{-6}$ , ponovitve $x_1$ , $x_2$ , $x_3$ po zaključku inkubacije na gojišču WL agar.....                                                                                | 30   |
| Slika 8: Kvasovke <i>Dekkera bruxellensis</i> ZIM 701, redčitev $10^{-6}$ , ponovitve $x_1$ , $x_2$ , $x_3$ na gojišču WL agar po zaključku inkubacije. ....                                                                                   | 30   |
| Slika 9: Kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC-1118, redčitev $10^{-6}$ , ponovitve $x_1$ , $x_2$ , $x_3$ , po zaključku inkubacije na gojišču WL agar.....                                                                              | 31   |
| Slika 10: Gelska elektroforeza produktov klasičnega PCR z oligonukleotidnimi začetniki Brett1/Brett2 in DNK izolirano iz različnih sevov ter negativna kontrola za izbiro oligonukleotidnih začetnikov za uporabo pri PCR v realnem času. .... | 31   |
| Slika 11: Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov Brett1/Brett2, $c = 50\text{nM}/50\text{nM}$ , primer poteka PCR v realnem času; os $x - C_q$ vrednosti, os $y - \Delta R_n$ . ....                                                        | 32   |
| Slika 12: Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov Brett1/Brett2, $c = 50\text{nM}/50\text{nM}$ , primer disociacijske krivulje; os $x - \text{temperatura } (^{\circ}\text{C})$ , os $y - \text{derivat}$ . ....                             | 33   |
| Slika 13: Umeritvena krivulja pridobljena na podlagi serijske redčitve genomske DNK <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1927; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; vrednosti so povprečje treh ponovitev. ....                                | 35   |
| Slika 14: Umeritvena krivulja izdelana na podlagi serijske redčitve genomske DNK <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EC-1118; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; vrednosti so povprečje treh ponovitev. ....                                    | 36   |
| Slika 15: Umeritvena krivulja izdelana na podlagi serijske redčitve genomske DNK <i>Dekkera bruxellensis</i> ZIM 701; začetni oligonukleotidi: Brett1/Brett2, vrednosti so povprečje treh ponovitev. ....                                      | 37   |
| Slika 16: Dinamika spreminjanja števila kvasovk določena z različnimi metodami med spontano fermentacijo pravega mošta. ....                                                                                                                   | 39   |

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 17: Dinamika spreminjanja števila kvasovk določena z različnimi metodami med fermentacijo pravega mošta z dodanima sevoma <i>D. bruxellensis</i> ZIM 701 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927..... | 39 |
| Slika 18: Dinamika spreminjanja števila kvasovk določena z različnimi metodami med fermentacijo pravega mošta z dodanima sevoma <i>D. bruxellensis</i> ZIM 701 in <i>S. cerevisiae</i> EC-1118.....  | 40 |
| Slika 19: Dinamika števila kvasovk določena z različnimi metodami med fermentacijo pravega mošta z dodanim sevom <i>S. cerevisiae</i> EC-1118. ....                                                  | 40 |
| Slika 20: Določanje števila kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>Dekkera bruxellensis</i> z različnimi metodami v vzorcih vina z izkazano senzorično napako. ....                           | 41 |

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati izdelave umeritvene krivulje z začetnimi oligonukleotidi ScerF/ScerR, sev *S. cerevisiae* ZIM 1927.

Priloga B: Rezultati izdelave umeritvene krivulje z začetnimi oligonukleotidi ScerF/ScerR, sev *S. cerevisiae* EC-1118.

Priloga C: Rezultati izdelave umeritvene krivulje z začetnimi oligonukleotidi Brett 1/Brett 2, sev *Dekkera bruxellensis* ZIM 701.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                        |                                                                                                                    |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| bp                     | Bazni par                                                                                                          |
| CFU                    | (ang. Colony Forming Units) Število mikroorganizmov, ki lahko tvorijo kolonije                                     |
| CTAB                   | Cetil-trimetil-amonijev bromid                                                                                     |
| <i>D. bruxellensis</i> | <i>Dekkera bruxellensis</i>                                                                                        |
| DNK                    | Deoksiribonukleinska kislina                                                                                       |
| FRET                   | (ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer) fluorestenčno resonančni prenos energije                             |
| ITS                    | (ang. Internal Transcribed Spacer) notranja prepisujoča se regija                                                  |
| NADH                   | Nikotinamid adenin dinukleotid                                                                                     |
| NTC                    | (ang. Non Template Control) kontrola brez matrične DNK                                                             |
| PCR                    | (ang. Polymerase Chain Reaction) verižna reakcija s polimerazo                                                     |
| qPCR                   | (ang. Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction) kvantitativna verižna reakcija s polimerazo v realnem času |
| rpm                    | (ang. Rotations per minute) obrati na minuto                                                                       |
| <i>S. cerevisiae</i>   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                                                                    |
| ZIM                    | Zbirka industrijskih mikroorganizmov                                                                               |

## 1 UVOD

Tradicionalno se vino prideluje z naravno fermentacijo grozdnega soka s pomočjo kvasovk, ki izvirajo iz grozdja in vinarske opreme. V začetni stopnji fermentacije so prisotne številne vrste kvasovk, ki v kasnejših fazah odmrejo in pustijo *Saccharomyces cerevisiae*, da kot dominantna vrsta zaključi fermentacijo (Heard in Fleet, 1985). Kljub pomembni vlogi pri proizvodnji vina, *S. cerevisiae* spada skupaj s kvasovko *Dekkera bruxellensis* med pomembne kvarljivce vina med procesom zorenja ali že ustekleničenega vina (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Obe vrsti sta sposobni preživeti visoke koncentracije etanola in vršiti proces refermentacije med zorenjem in staranjem vina v sodih oziroma steklenicah (Millet in Lonvaud-Funel, 2000; Divol in sod., 2005). Refermentacija spreminja razmerje etanol/sladkor in vpliva na aromo vina, kar povzroča zmanjšanje njegove kakovosti in kvar (Divol in Lonvaud-Funel, 2005).

Vino je kot medij izjemno primerno za rast različnih vrst mikroorganizmov, saj je bogato z organskimi kislinami, aminokislinami, ostanki sladkorjev, rastnimi faktorji in mineralnimi solmi (Fernández-Espinar in sod., 2011). Ker pri fermentaciji vina sodelujejo številne vrste kvasovk in bakterij, je meja med koristno mikrobno aktivnostjo in kvarom težko določiti. Iz tega razloga se prisotnost kvarljivcev le redko določa tekom fermentacije. Povsem drugače pa je s tem med hranjenjem, staranjem in stekleničenjem vina, kljub dejstvu, da je kontrola prisotnosti kvarljivcev pomembna na vseh stopnjah procesa (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

Za določanje prisotnosti in števila kvasovk je na voljo več različnih metod, vendar so za enologe najpomembnejše tri. To so štetje pod mikroskopom, gojenje na trdnem gojišču in membranska filtracija. Omenjene metode spadajo med klasične metode določanja števila kvasovk (Fugelsang in Edwards, 2007). Za spremljanje fermentacije vina in detekcijo kvarljivcev, potrebuje vinarska industrija hitre postopke določanja števila kvasovk. Klasične metode so sicer učinkovite, vendar večinoma temeljijo na namnoževanju in so posledično dolgotrajne. Za vinarje to predstavlja problem, saj se s tem prestavijo tudi odločitve v zvezi s procesiranjem vina. V zadnjih letih so raziskovalci za neposredno določanje kvasovk pričeli uporabljati metode, ki ne vključujejo namnoževanja. Večina teh metod temelji na neposrednem pomnoževanju DNK kvasovk iz vina v verižni reakciji s polimerazo (PCR) (Hierro in sod., 2006). Ena izmed takih metod je tudi PCR v realnem času (qPCR), ki se je izkazala kot hitra, neposredna, občutljiva in zanesljiva metoda za določanje števila kvasovk (Hierro in sod., 2007).

### 1.1 CILJ EKSPERIMENTALNE NALOGE

- primerjava metode z uporabo PCR v realnem času in klasičnih metod z namnoževanjem za določanje števila kvasovk
- postavitev in optimizacija metode za določanje kvasov *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* s PCR v realnem času,
- preizkus primerljivosti klasičnih in sodobnih metod za določanja števila kvasovk v realnih vzorcih mošta in vina

- vpeljava učinkovite, specifične in občutljive metode, za določanje prisotnosti kvarljivcev v realnih vzorcih vina in mošta.

## 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

- ✓ Metoda za določanje števila *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* v realnih vzorcih z uporabo PCR v realnem času je v primerjavi s klasičnimi metodami hitrejša, bolj občutljiva in bolj zanesljiva.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KVASOVKE

Kvasovke so enocelične glive, ki se nespolno razmnožujejo z brstenjem ali cepitvijo. Kvasovke spadajo v skupino pravih gliv (Fungi), v debli Ascomycota in Basidiomycota (Blackwell in sod., 2009). Vinske kvasovke najdemo le znotraj debela Ascomycota (Romano in sod., 2003). V sodobni literaturi o taksonomiji kvasovk je opisanih okoli 800 vrst, od katerih jih lahko samo četrtino najdemo v hrani, le nekaj izmed njih pa uvrščamo med pomembne kvarljivce. Prvi in najpomembnejši kvarljivec v procesu pridelave vina na tem seznamu je prav gotovo *Saccharomyces cerevisiae* (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

#### 2.1.1 Vinske kvasovke

Termin vinske kvasovke opisuje kvasovke, ki jih najdemo na grozdju ali v vinogradu, v vinu in moštu, v vinarskih poslopih in na opremi. Divje kvasovke so ne-*Saccharomyces* kvasovke, ki jih najdemo na grozdju in lahko, vsaj na začetku, sodelujejo pri fermentaciji vina. Med divje kvasovke prištevamo vrste iz rodov *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Pichia* in *Metschnikowia*. Med vinske kvasovke spadajo številni sevi *Saccharomyces cerevisiae*, ki lahko izpeljejo popolno fermentacijo grozdnega soka, in ob enem zagotovijo fermentiran produkt s prijetnim vinskim vonjem in okusom. Kvasovke redu *Shizosaccharomyces* lahko prav tako popolnoma fermentirajo grozdni sok in se pogosto omenjajo kot alternativa za *Saccharomyces*, vendar je produkt fermentacije s *Shizosaccharomyces* pogosto neprijeten. Na podlagi zgornje definicije, lahko med vinske kvasovke vključimo še vrste iz rodov *Dekkera/Brettanomyces* in *Zygosaccharomyces* (Boulton in sod., 1996).

#### 2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* so enocelične glive, ki se razmnožujejo nespolno z multilateralnim brstenjem in spolno s pomočjo askospor. Aski so odporni in vsebujejo eno do štiri kroglaste askospore. Vegetativne celice so kroglaste, ovalne ali cilindrične oblike. Kvasovka *S. cerevisiae* je najbolj znana po vlogi pri proizvodnji kruha in fermentiranih alkoholnih pijač. *S. cerevisiae* pretvori heksoze v etanol, ogljikov dioksid in različne spojine vključno z alkoholi, estri, aldehidi in kislinami, ki prispevajo k senzoričnim lastnostim hrane in pijače (Viljoen in Heard, 2000). Vloga in korist *Saccharomyces cerevisiae*, kot prevladujoče vrste pri fermentaciji vina, je dobro poznana. Kljub temu je *S. cerevisiae* po zaključku fermentacije sposobna povzročiti kvar vina v primeru, da kvasovka ni primerno odstranjena oziroma, če pride do rekontaminacije med stekleničenjem. Refermentacija spreminja razmerje etanol/sladkor in vpliva na aromo vina, kar povzroča zmanjšanje njegove kakovosti in kvar (Divol in Lonvaud-Funel, 2005). Zaradi tolerance na relativno visoke koncentracije etanola spada *S. cerevisiae* med pomembne kvarljivce vina. V glavnem jo najdemo v sladkih vinih, kjer rast podpirajo prisotni fermentabilni sladkorji, pa tudi v polsuhih ustekleničenih vinih (Martorell in sod., 2005).

### 2.1.3 *Dekkera bruxellensis*

*Dekkera bruxellensis* in njena anamorfna oblika *Brettanomyces bruxellensis* spadata med kvarljivce vina (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Leta 1904 so bile iz pozne fermentacije angleškega založnega piva izolirane kvasovke rodu *Brettanomyces*, vendar so bili sevi teh kvasovk podrobno proučevani in klasificirani šele po letu 1940. Zaradi askosporogenosti so bili naknadno nekateri sevi preneseni v rod *Dekkera*. Številne morfološke in fiziološke študije, ter filogenetske povezave pridobljene z analizo DNK, so dokazale, da so kvasovke rodu *Brettanomyces* in *Dekkera* istovrstne. Rodova se razlikujeta le v tem, da slednji izkazuje menjavo generacij s tvorbo askov in askospor. Kvasovka *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* je tako ena izmed štirih vrst kvasovk znotraj tega rodu *Dekkera*. Kvasovke *D. bruxellensis* se nesporno razmnožujejo z brstenjem. V eksponentni fazi rasti so celice lahko sferične oblike, lahko tudi koničaste ali cilindrične oblike (Jimenez in sod., 2000). Kvasovke rodu *Dekkera* so sposobne izvesti popolno alkoholno fermentacijo grozdnega soka, vendar le-ta poteka zelo počasi. Kljub temu, da ima tako vino, ko je še sveže, med drugimi okusi tudi sadno, dokaj prijetno noto, vrsto *Dekkera bruxellensis* prištevamo med kvarljivce vina. Kontaminacija vina s to vrsto ima namreč pomemben vpliv na okus in vonj. Najpogosteje se pojavljajo opisi, kot sta mišji vonj ali vonj po konjskem potu (Boulton in sod., 1996). *D. bruxellensis* redko izoliramo iz površine grozdja, je pa relativno pogost na vinarski opremi. Sprememba vina z *Dekkero* se navadno zgodi med staranjem vina v sodih ali cisternah (Mitrakul in sod., 1999). Zaradi produkcije fenolnih priokusov in zaradi sposobnosti rasti v vinu, je *D. bruxellensis* poleg *Saccharomyces cerevisiae* glavni kvarljivec vina (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

### 2.1.4 Kvar vina s kvasovkami

Kvasovke lahko povzročajo kvar vina na več stopnjah procesa. Če tekom alkoholne fermentacije rastejo neprimerne vrste ali sevi kvasovk, lahko nastane nesprejemljiv okus končnega proizvoda. Napake vključujejo vina s prekomerno koncentracijo vodikovega sulfida in drugih hlapnih žveplovih spojin, očetne kisline, različnih estrov ter hlapnih fenolov. Druga kritična točka, na kateri lahko pride do kvara je shranjevanje vina v cisternah in sodih. Vino, ki je izpostavljeno zraku hitro razvije površinsko floro slabo fermentativnih ali oksidativnih kvasovk, običajno rodov *Candida* in *Pichia*. Te vrste oksidirajo etanol, glicerol in kisline, pri čemer v vinu nastanejo nedopustno visoke koncentracije acetaldehida, estrov in očetne kisline. Nestekleničena in tudi stekleničena vina kvarijo fermentativne vrste *Zygosaccharomyces*, *Dekkera*, *Saccharomyces* in *Saccharomycodes*. Poleg tega, da povzročajo prekomerno vsebnost CO<sub>2</sub>, sedimente in motnost, te vrste proizvajajo neprijetne esterske in kislinske priokuse. S higieno in sledenjem dobri proizvodni praksi, lahko te tipe kvara v večini primerov uspešno preprečujemo. Prav tako lahko kvasna avtoliza po zaključku fermentacije predstavlja pomemben vir mikrohranil za rast kvarljivcev, zato odstranitev kvasne usedline kmalu po zaključku fermentacije močno zmanjša takšno tveganje (Fleet, 2003).

## 2.2 FERMENTACIJA

### 2.2.1 Fermentacija vina

Kvasovke izkoriščajo glukozo in fruktozo, ki sta poglavitna sladkorja v grozdnem soku, in ju presnavljajo po Embden-Mayerhof-Parnasovi glikolitični poti do piruvata. Omenjena metabolna pot zagotavlja kvasovkam energijo in redukcijsko moč za biosintezo. V anaerobnih pogojih kvasovke dekarboksilirajo piruvat do acetaldehida in CO<sub>2</sub> v reakciji, ki jo katalizira encim piruvat dekarboksilaza. Zadnji korak v alkoholni fermentaciji, v katerem se acetaldehid reducira v etanol, katalizira encim alkohol dehidrogenaza in vključuje reduciran koencim NADH. Poleg etanola in CO<sub>2</sub> je kvantitativno najbolj pomemben produkt fermentacije z vinskimi kvasovkami glicerol. V vinu najdemo, v odvisnosti od kvasnega seva in pogojev fermentacije, spremenljivo raven glicerola (običajno v območju 2-10 g l<sup>-1</sup>). Glikoliza je glavni mehanizem razgradnje ogljikovih spojin s kvasovkami, kljub temu med fermentacijo grozdnega soka delujejo tudi druge metabolne poti, vključno s potjo pentoze fosfata in ciklom citronske kisline. Omejeno delovanje slednjega, v vinu zagotavlja relativno visok nivo jantarne kisline (tipično okoli 0,5 g l<sup>-1</sup>). Produkt metabolizma dušikovih in žveplovih spojin so številni hlapni in nehlapni stranski metaboliti, ki skupaj z glavnimi metaboliti fermentacije pripomorejo k okusu in aromi vina. Relativne koncentracije teh spojin so odvisne od seva kvasovk in pogojev pri katerih fermentacija poteka (Walker, 2000).

### 2.2.2 Dinamika kvasovk med fermentacijo vina

Fermentacija grozdnega sok predstavlja kompleksen ekosistem, ki vključuje rast in biokemijsko aktivnost mešanice kvasnih vrst in sevov. Kvasovke udeležene v fermentaciji izvirajo iz grozdja, iz vinarskih površin in opreme, ter dodanih starterskih kultur. Fermentacijo začnejo vrste iz rodov *Hanseniaspora*/*Kloeckera*, *Candida* in *Metschnikowia*, ki v glavnem izvirajo iz površine grozdja. V tej fazi lahko rastejo tudi vrste rodov *Pichia*, *Issatchenkia* in *Kluyveromyces*. Te kvasovke rastejo do koncentracije približno 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> CFU/mL, vendar v srednji fermentaciji pričnejo propadati in odmrejo. Na tej stopnji začne prevladovati *S. cerevisiae*, ki doseže koncentracijo 10<sup>7</sup> – 10<sup>8</sup> CFU/mL ter tako nadaljuje in tudi zaključi fermentacijo. Na pojavnost in rast kvasovk med alkoholno fermentacijo vplivajo številni dejavniki. Med njimi so začetna populacija in raznolikost vrst in sevov v grozdnem soku, inokulacija soka z izbranimi starterskimi kulturami, kemijska sestava soka, vključno s fungicidnimi/pesticidnimi ostanki, procesni pogoji, kot sta dodatek žveplovega dioksida in temperatura fermentacije, ter interakcije med vrstami in sevi kvasovk. Produkcijo etanola s strani *S. cerevisiae* štejemo kot najpomembnejši dejavnik, ki uravnava rast in vpliv ne-*Saccharomyces* vrst med fermentacijo. *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia* in *Metschnikowia* namreč niso odporne na koncentracije etanola, ki presegajo 5-7 %. To pojasni upadanje njihovega števila ter smrt v stopnji, ko fermentacija napreduje preko srednje faze. Naraščanje koncentracije etanola med alkoholno fermentacijo lahko pojasni tudi zaporedno rast posameznih sevov znotraj vrst. Sevi *S. cerevisiae* se, tako kot sevi drugih vrst, razlikujejo v tolerančnosti na etanolni stres. Sevi z višjo toleranco do etanola bodo tako z večjo verjetnostjo prevladovali v kasnejših fazah fermentacije (Fleet, 2003).

## 2.3 KLASIČNE METODE DOLOČANJA ŠTEVILA KVASOVK

Ocena gostote in raznolikosti mikrobnih populacij ima pomembno vlogo v procesu proizvodnje vina. Gostoto populacije lahko določamo z različnimi metodami, vendar so za enologe najpomembnejše tri. To so štetje pod mikroskopom, gojenje na trdnem gojišču in membranska filtracija. Štetje pod mikroskopom je najhitrejša metoda, vendar je za to potrebno najmanj  $10^4$  celic/mL. Ker pri nizkih koncentracijah z mikroskopiranjem ne moremo določiti števila mikroorganizmov, se takrat poslužujemo gojenja na trdnem gojišču. Slabost te metode je, da je včasih potrebno vzorce redčiti, zahteva tudi čas za inkubacijo. Membranska filtracija, ki ji sledi gojenje na trdnem gojišču, se uporablja pri vzorcih, kjer pričakujemo nizko živost populacijo ( $< 25$  celic/mL). Pri tej metodi pred prenosom na trdno gojišče celice skoncentriramo na membrani. Poleg omenjenih metod, se za določanje števila kvasovk uporabljajo še bioluminiscenca in spektroskopija (Fugelsang in Edwards, 2007).

### 2.3.1 Neposredno štetje z mikroskopiranjem

Tehnika, ki se najpogosteje uporablja za neposredno določanje mikrobne koncentracije v vinu, je mikroskopiranje z uporabo števne komore (Amerine in Kunkee, 1968). Tehnike štetja celic z mikroskopiranjem je hitra metoda, ki se uporablja za določanje gostote populacije in, v nekaterih primerih, za predhodno identifikacijo. Pri tej metodi nanese vzorec grozdnega soka ali vina na posebno oblikovano števno ploščico, imenovano hemocitometer in ga pokrijemo s krovnim stekelcem. Natančno določen volumen tekočine v komori omogoča določanje števila enostavno s preštevanjem celic znotraj območja, določenega z mejami mrežice na števni ploščici. Prednost metode je predvsem v hitrosti, vendar je zaradi izjemno majhnega volumna vzorca za to metodo potrebna koncentracija najmanj  $10^4$  celic/mL. Poleg tega pri neposrednem štetju z mikroskopiranjem predstavlja problem dejstvo, da s to metodo preštejemo žive in nežive celice, zato so rezultati težko primerljivi z rezultati, ki jih pridobimo z gojenjem na trdnem gojišču (Fugelsang in Edwards, 2007).

### 2.3.2 Štetje z gojenjem na trdnem gojišču

Poznamo dve različici metode gojenja na trdnem gojišču, in sicer gojenje na trdnem gojišču s prelivanjem ter gojenje na trdnem gojišču z razmazovanjem. Pri prvi različici vzorec prenesemo v petrijevko in ga prelijemo s temperiranim medijem z agarjem, med tem ko pri drugi vzorec nanese na predpripravljeno trdno gojišče in ga enakomerno razmažemo po celotni površini. Po inkubaciji po določenem času in pri določeni temperaturi bo teoretično iz vsake celice prisotne v prvotnem vzorcu zrasla kolonija, ki je vidna s prostim očesom. Na podlagi števila kolonij in volumna uporabljenega vzorca, lahko izračunamo število viabilnih mikroorganizmov na mililiter vzorca. To vrednost označujemo kot »colony forming units« CFU na mililiter. Obe metodi se uporabljata za določanje števila mikroorganizmov v vzorcih grozdnega soka in vina (Fugelsang in Edwards, 2007).

### 2.3.3 Štetje z membransko filtracijo

Pri tej metodi prefiltriramo preko sterilnega membranskega filtra določen volumen vzorca. Največkrat se uporabljajo filtri z velikostjo por 0,45 µm ali manj. Po filtraciji membrano aseptično prenesemo na trdno gojišče in inkubiramo. S štetjem kolonij nato določimo CFU na določen volumen vzorca. Ta metoda je primerna za vzorce, ki naj ne bi vsebovali mikroorganizmov ali za vzorce v katerih pričakujemo nizko živost populacije mikroorganizmov. Metoda ni primerna kadar vzorec vsebuje delce, ki lahko zamašijo pore in naredijo membrano neprepustno. Metoda se uporablja za določanje prisotnosti mikroorganizmov v stekleničenih vinih (Fugelsang in Edwards, 2007).

## 2.4 SODOBNE METODE DOLOČANJA ŠTEVILA KVASOVK

Tekom zadnjih dvajsetih let so raziskave v molekularni biologiji privedle do razvoja metod s katerimi je možno določanje števila mikroorganizmov ob zelo nizki gostoti populacije in v znatno krajšem času, kot pri klasičnih metodah. Med sodobne metode določanja števila mikroorganizmov prištevamo med drugim tudi metodo najverjetnejšega števila, turbidimetrijo, ter kvantitativni PCR (Fugelsang in Edwards, 2007).

### 2.4.1 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda pri kateri encimsko pomnožujemo izbran del tarčnega zaporedja DNK, pri čemer v kratkem času pridobimo veliko število kopij. Od pionirske raziskave in razvoja, ki ga je opisal Mullis (1990), je PCR postal eno izmed osnovnih in široko uporabljenih orodij v molekularno bioloških laboratorijih (Fugelsang in Edwards, 2007).

PCR poteka v treh korakih:

- Denaturacija: pride do denaturacije dvoverižne DNK s segrevanjem, običajno pri temperaturi 94 °C, pri čemer nastaneta komplementarni enoverižni DNK verigi.
- Prileganje: hitro ohlajanje na temperaturo prileganja omogoči hibridizacijo oligonukleotidnih začetnikov na matrično DNK.
- DNK sinteza: Segrevanje reakcije na 72 °C, kar omogoči učinkovito sintezo DNK s pomočjo termostabilne DNK polimeraze.

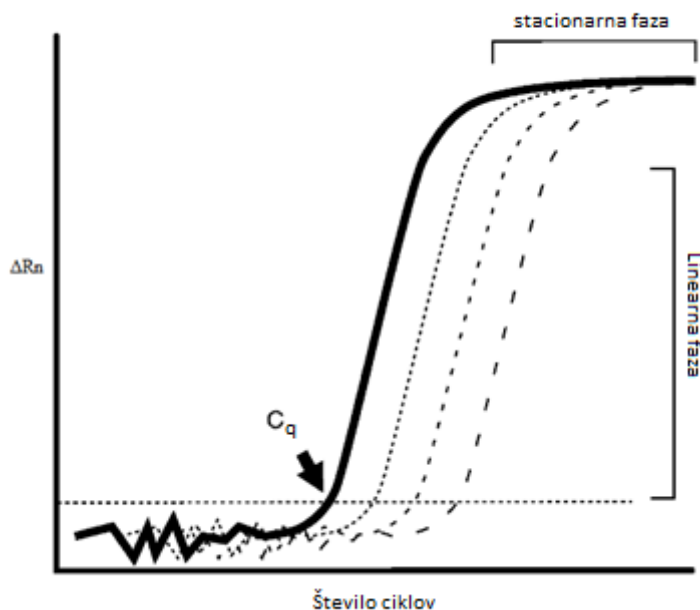
PCR uporablja dva oligonukleotidna začetnika, ki delujeta kot označevalca mesta začetka sinteze DNK s polimerazo DNK, in tako določata območje matrične DNK, ki bo podvojeno. Začetnika sta komplementarna regijama znanega zaporedja na nasprotnih verigah matrične DNK s 3'-OH koncem obrnjenim proti drugemu začetniku. Polimeraza DNK podaljša oligonukleotidni začetnik z vgrajevanjem deoksinukleotidov (dATP, dGTP, dCTP in dTTP) tako, kot to določa matrika. Tekom vsakega cikla PCR se pomnoži zaporedje, ki se nahaja med dvema vezavnima mestoma oligonukleotidnih začetnikov. Pomnožke lahko nato enostavno določamo z agarozno gelsko elektroforezo. (McPherson in Møller, 2006)

#### 2.4.2 PCR v realnem času

Tehnologija PCR v realnem času (qPCR) temelji na sposobnosti detekcije in kvantifikacije pomnožkov PCR med potekom pomnoževanja (Fairchild in sod., 2006). Spremljanje nastajanja pomnožkov v realnem času omogočajo označeni oligonukleotidni začetniki, sonde ali pomnožki z molekulam, ki so sposobne fluorescence. Ti označevalci povzročijo spremembo v signalu, ki je posledica neposredne interakcije s pomnožkom oziroma vezave na pomnožek (Mackay, 2004).

Obstaja več načinov detekcije produkta PCR na podlagi merjenja fluorescence. Najenostavnejša in najpogostejše uporabljena metoda za detekcijo novonastalih produktov PCR je z uporabo fluorescentnega barvila SYBR Green I, ki se specifično veže na mali žleb dvovijačne DNK (Morrison in sod., 1998). Ko vzorcu DNK dodamo reakcijsko mešanico, se barvilo SYBR Green I nemudoma veže na vse doveržne molekule DNK. Tekom PCR polimeraza pomnožuje tarčno sekvenco, pri čemer nastaja pomnožek. SYBR Green I se veže na vsako novonastalo kopijo dvoverižne DNK. Z napredovanjem reakcije narašča intenzivnost fluorescence, ki je sorazmerna z nastankom dvoverižnega DNK pomnožka. Pri SYBR Green I gre za nespecifično določanje pomnožkov, zato se lahko barvilo veže tudi na nespecifične dvoverižne DNK pomnožke. Možnost lažno pozitivnega rezultata lahko preverimo z analizo disociacijske krivulje. Določanje specifične temperature taljenja specifične molekule DNK nam omogoča faza disociacije, ki jo dodamo na koncu pomnoževanja (Applied Biosystems, 2006).

Alternativa nespecifičnim metodam določanja pomnožkov PCR v realnem času so specifične metode določanja pomnožkov. Ena izmed teh metod vključuje uporabo sonde TaqMan®. Pri TaqMan® PCR v realnem času se interna fluorogena oligonukleotidna sonda veže na tarčno sekvenco DNK znotraj vezavnih mest oligonukleotidnih začetnikov. Oligonukleotidna sonda vsebuje reportersko barvilo ki oddaja fluorescenco, ter supresorsko barvilo, ki preprečuje prvemu fluorescentno aktivnost preko fluorescentno resonančnega prenosa energije (FRET). Med fazo podaljševanja, nukleazna aktivnost DNK polimeraze odcepi fluorescentno hibridizacijsko sondo, kar lahko zaznamo kot povečanje fluorescence (Heid, 1996).



**Slika 1:** Prikaz idealne krivulje intenzivnosti fluorescence v odvisnosti od števila ciklov PCR v realnem času (Mackay, 2004).

Idealna krivulja pomnoževanja PCR v realnem času, ki jo prikažemo kot intenzivnost fluorescence v odvisnosti od števila ciklov, ima sigmoidno obliko. V prvih ciklih pomnoževanja emitirane fluorescence ne moremo zaznati, ker je prikrita s šumi iz ozadja. Ko koncentracija pomnožka preseže določeno količino, začne signal eksponentno naraščati, krivulja preide v linearno fazo. V idealnih razmerah količina pomnožka narašča za  $1 \log_{10}$  na 3,32 cikla. Ko postane količina oligonukleotidnih začetnikov in encima omejujoča in produkt inhibitoren za PCR, se reakcija upočasni in vstopi v stacionarno fazo, kjer se fluorescence povečuje le še malo ali se ne povečuje več. Točka, kjer krivulja fluorescence preseže šum iz ozadja, imenujemo cikel meje zaznavanja in jo označujemo kot  $C_q$  vrednost. To vrednost uporabljamo za izračun količine tarčne sekvence pri kvantitativnem PCR v realnem času (Mackay, 2004).

### 2.4.3 Kvantitativni PCR v realnem času

Kvantitativni PCR v realnem času je analiza s katero določamo količino tarčne nukleinske kisline med vsakim ciklom pomnoževanja s PCR. Tarčne molekule lahko predstavljajo DNK, cDNK ali RNK (Applied Biosystems, 2006). Pri kvantitativnem PCR v realnem času uporabimo vrednost  $C_q$  za izračun začetne količine tarčne DNK.  $C_q$  je definiran kot cikel PCR, v katerem porast fluorescence ustvarjene z akumuliranim pomnožkom preseže deset standardnih deviacij povprečne izhodiščne fluorescence z uporabo podatkov pridobljenih v ciklih od 3 do 15.  $C_q$  je sorazmeren številu tarčnih kopij v vzorcu. V praksi  $C_q$  izračunamo po določitvi meje zaznavanja, ki izključuje podatke iz začetnih ciklov PCR, ki jih ne moremo razlikovati od šuma iz ozadja. Končna vrednost  $C_q$  predstavlja vmesni cikel, v katerem posamezna vrednost fluorescence seka izrisano krivuljo posameznega vzorca (Mackay, 2004).

Kvantifikacija tarčne DNK je lahko absolutna ali relativna. Relativna kvantifikacija določa spremembo v količini tarčne DNK v primerjavi s količino te DNK v istem ali sorodnem materialu in ju primerja s signalom notranje ali druge referenčne kontrole. Absolutna kvantifikacija je zahtevnejša, vendar omogoča določanje točnega števila tarčne nukleinske kisline v vzorcu v povezavi z določenimi enotami, kar omogoča primerjavo rezultatov. Zanesljivost kvantitativnih PCR metod je tesno povezana z izbiro in kakovostjo kontrol. Notranja kontrola se uporablja za določanje lažno negativnih rezultatov, ugotavljanja sposobnosti podvojevanja nukleinskih kislin in tudi kot standard za kvantifikacijo. Zunanjo kontrolo najpogosteje predstavlja kloniran pomnožek, del tarčnega genoma ali čisti pomnožek. Zunanja kontrola tvori osnovo standardne krivulje, ki jo naredimo na podlagi podatkov pridobljenih z individualnim pomnoževanjem serije redčitev zunanje kontrole. Neznano koncentracijo, ki jo pomnožujemo v isti reakcije vendar v ločeni mikrocentrifugirki, lahko nato razberemo iz standardne krivulje (Mackay, 2004).

Učinkovitost PCR je eden izmed najpomembnejših parametrov verižne reakcije s polimerazo. Če jo pravilno izvedemo s tem povečamo natančnost kvantitativnega PCR v realnem času. Učinkovitost lahko določimo z več različnimi metodami. Metoda z razredčevanjem predstavlja eno izmed teh metod. Učinkovitost reakcije določimo z izvedbo PCR v realnem času na serijskih redčitvah vzorca. Na podlagi pridobljenih podatkov za vsako redčitev določimo  $C_q$  vrednost in izrišemo premico odvisnosti  $C_q$  vrednosti od začetne koncentracije DNK, ki jo izračunamo iz enačbe (1) (Rebrikov in Trofimov, 2006).

$$y = k * x + n \quad \text{oz.} \quad C_q = k * \log C + n \quad \dots(1)$$

Pri izračunu parametrov premice je potrebno določiti območje linearnosti in izračunati korelacijski koeficient ( $R^2$ ), ki naj bi bili čim bližje vrednosti 1,0. (Pfaffl, 2001; Pfaffl in sod., 2002) Iz enačbe lahko vidimo, da koeficient  $k$  predstavlja število ciklov, ki so potrebni, da se fluorescentni signal poveča za en velikostni razred. Posledično vrednost  $1/k$  kaže na količino DNK, ki jo pridobimo v enem ciklu pomnoževanja. Ker je učinkovitost reakcije število, ki predstavlja povečanje količine pomnoženih DNK fragmentov v enem ciklu, jo lahko izračunamo iz enačbe (2) (Rebrikov in Trofimov, 2006).

$$E = \left( -1 + 10^{\left( \frac{1}{k} \right)} \right) * 100 \quad \dots(2)$$

Učinkovitost PCR je zadovoljiva, kadar je vrednost koeficienta ( $k$ ) v enačbi premice med vrednostma -3,1 in -3,6 ter izračunana učinkovitost ( $E$ ) med 90 % in 110 % (Pfaffl, 2001). Na učinkovitost PCR v realnem času vplivajo številni dejavniki, med njimi tudi inhibitorji encimske reakcije, degradacija DNK, nespecifični pomnožki, sekundarna struktura pomnožka, vrsta oligonukleotidnih začetnikov, dolžina pomnožka, koncentracija DNK,

sestava reakcijske mešanice, razmere pomnoževanja, fluorogena barvila, laboratorijska praksa ter vrsta in značilnost aparata za PCR v realnem času (Pfaffl, 2004; Dorak, 2006).

#### 2.4.4 Določanje števila kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* s PCR v realnem času

Kljub temu, da so kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* pomembni kvarljivci v proizvodnji vina, in da je metoda kvantifikacije mikroorganizmov s PCR v realnem času relativno uveljavljena, najdemo le nekaj avtorjev, ki v člankih opisujejo določanje teh dveh vrst kvasovk z omenjeno metodo.

Martorell in sodelavci (2005) so prvi razvili in opisali metodo s PCR v realnem času za neposredno določanje števila *S. cerevisiae* v vzorcih vina, ki vinarjem zagotavlja hitro in občutljivo metodo za detekcijo in preprečevanje kvara vina. Specifične oligonukleotidne začetnike so oblikovali na podlagi informacije o zaporedju pridobljenem iz kloniranega naključno pomnoženega polimorfnega dela DNK, ki *S. cerevisiae* razlikuje od sorodnih vrst. Metoda se je izkazala kot uporabna za neposredno določanje nivoja omenjene vrste brez predhodne obogatitve tako v sladkih kot tudi v rdečih vinih, če je kvasovka prisotna v koncentraciji 3,8 oziroma 5 CFU/mL.

Leta 2006 so Hierro in sodelavci razvili kvantitativni PCR v realnem času za detekcijo in določanje skupnega števila kvasovk v vinu brez namnoževanja. Univerzalne oligonukleotidne začetnike so oblikovali na podlagi variabilne D1/D2 domene gena za 26 rRNA. Začetniki so izkazovali visoko specifičnost za vse vinske kvasovke, vključno z *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*, in niso pomnoževali reprezentativnih vinskih vrst oacetnokislinskih in mlečnokislinskih bakterij. Leta 2007 so isti avtorji razvili kvantitativni PCR za spremljanje dveh najpomembnejših skupin kvasovk v alkoholni fermentaciji, *Saccharomyces* in *Hanseniaspora*. Specifični začetniki so bili oblikovani na podlagi zaporedja, ki zajema ITS2 in gen za 5,8S rRNA. Metoda je omogočala učinkovito določanje števila celic do koncentracije 10 celic mL<sup>-1</sup>, v primeru ko je bila standardna krivulja narejena na podlagi redčitev DNK, in do koncentracije 10<sup>2</sup> celic mL<sup>-1</sup>, v primeru ko je bila standardna krivulja narejena na podlagi kvasovk inkubiranih v vinu. Poleg tega so rezultati pridobljeni s kvantitativnim PCR v realnem času izkazovali dobro korelacijo z rezultati določanja CFU mL<sup>-1</sup> (Hierro in sod., 2007).

Salinas in sodelavci (2009) so razvili metodo s kvantitativnim PCR v realnem času za hitro določanje in kvantifikacijo števila *S. cerevisiae* v vinu, ki vključuje uporabo hibridizacijske sonde (TaqMan<sup>®</sup>). Metoda se je izkazala kot specifična, ponovljiva, občutljiva in hitra. Glavna prednost omenjene metode je, da za potrditev rezultatov ni potrebna dodatna analiza disociacijske krivulje. (Salinas in sod., 2009)

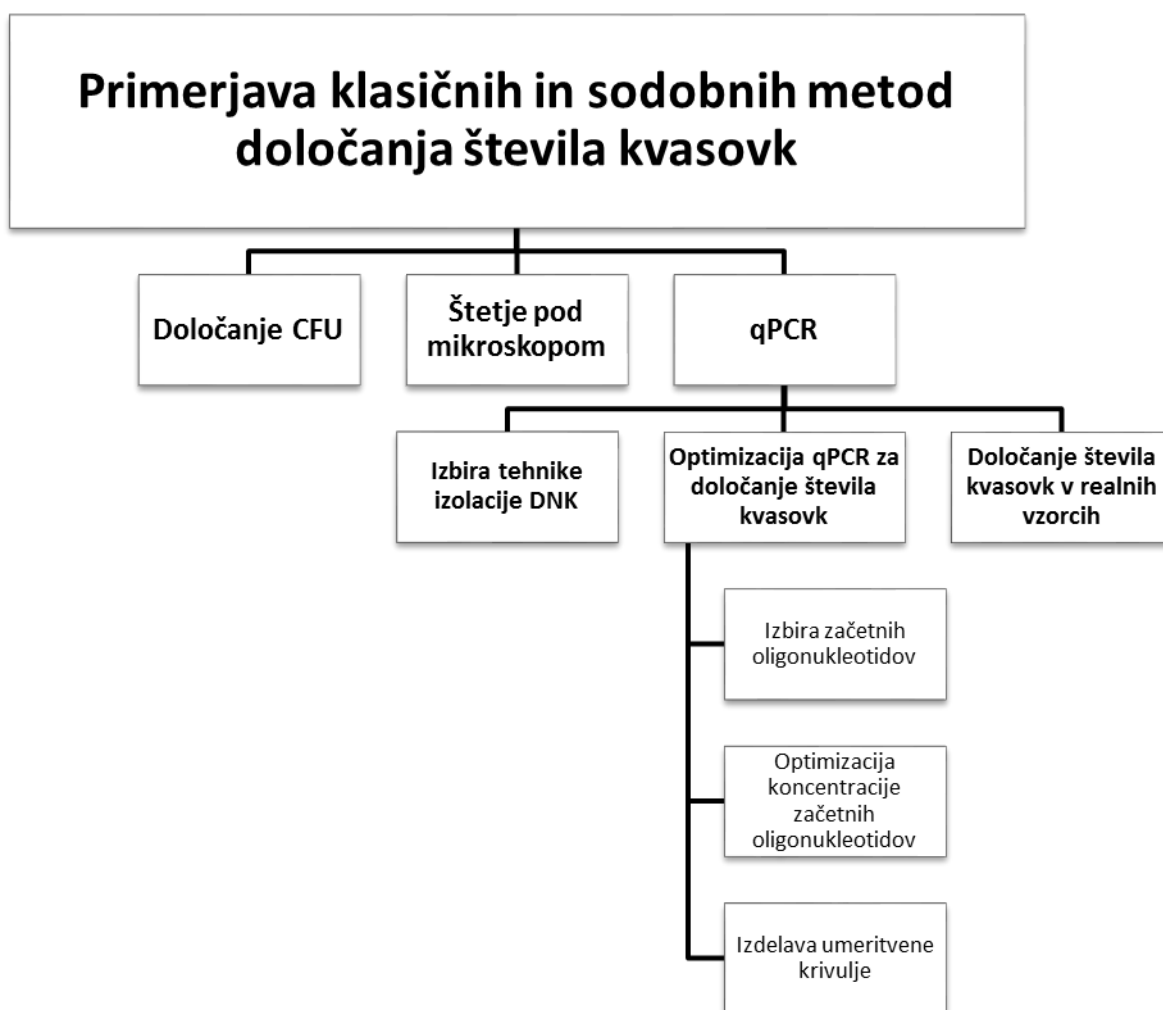
Leta 2003 sta Phister in Mills prva razvila metodo s PCR v realnem času za neposredno detekcijo in določanje števila *D. bruxellensis* v vinu. Specifični začetni oligonukleotidi so bili oblikovani na podlagi zaporedja gena za 26S podenoto rRNA in niso pomnoževali netarčnih vrst kvasovk in bakterij. Opisana metoda je omogočala detekcijo 1 celice na mL vina, poleg tega velika količina netarčnih kvasovk v vzorcu ni vplivala na njeno učinkovitost (Phister in Mills, 2003). Skoraj sočasno so metodo s PCR v realnem času za detekcijo in kvantifikacijo *D. bruxellensis* in *Pediococcus damnosus* v vinu postavili tudi

Delaherche in sodelavci (2004). Meja detekcije omenjene metode je bila  $10^4$  CFU/mL (Delaherche in sod., 2004).

Tessonnière in sodelavci so leta 2009 predlagali izboljšave obstoječih metod s PCR v realnem času za detekcijo *D. bruxellensis*, ki bi povečale njihovo robustnost. Testirali so različne načine izolacije DNK iz vina in izbrali najboljšo. Prav tako so testirali različne reakcijske mešanice za PCR v realnem času in izbrali najuspešnejšo. Z dodatkom PVPP med ekstrakcijo DNK h klasičnemu fenol:kloroform protokolu so uspešno odstranili inhibitorje PCR iz vina. Razvili so tudi interno kontrolo, ki je omogočila prepoznavanje lažno negativnih rezultatov, ki so posledica zmanjšane učinkovitosti izolacije DNK in/ali pomnoževanja. Oligonukleotidni začetniki so bili oblikovani za specifično vezavo na tarčni RAD4 gen. Specifičnost, linearnost, ponovljivost in reproduktivnost metode so bili ovrednoteni v medlaboratorijski študiji (Tessonnière in sod., 2009).

### 3 MATERIAL IN METODE

V tem poglavju so opisani materiali in metode, ki smo jih uporabili pri izvedbi poskusa v okviru delovne hipoteze (poglavje 1.2). Cilj poskusa je postaviti metodo PCR v realnem času za določanje števila kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* s PCR v vzorcih mošta-vina in jo primerjati s klasičnimi metodami določanja števila kvasovk.



Slika 2: Hodogram aktivnosti poskusa

### 3.1 MATERIALI

V tem poglavju so navedeni materiali uporabljeni v eksperimentalnem delu. Materiali so glede na vrsto razvrščeni v posamezne skupine.

#### 3.1.1 Sevi mikroorganizmov

Seve smo dobili iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Uporabili smo še sev *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118, komercialni sev Lalvin® proizvajalca Lallemand iz Francije.

**Preglednica 1: Uporabljeni sevi mikroorganizmov**

| Vrsta                           | Oznaka   | vir                             |
|---------------------------------|----------|---------------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | ZIM 1927 | mošt Malvazije, Slovenija       |
| <i>Dekkera bruxellensis</i>     | ZIM 701  | mošt Rebule, Slovenija          |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | EC-1118  | starter kultura, mošt, Francija |
| <i>Aspergillus oryzae</i>       | ZIM F21  | neznan izvor                    |

#### 3.1.2 Vzorci

Za postavitev metode določanja števila kvasovk v realnih pogojih smo uporabili dve skupini vzorcev. Prvo skupina predstavlja dvainpetdeset vzorcev fermentirajočega mošta kontaminiranega s sevi ZIM 701 in ZIM 1927 projektne dela Katarine Karničar. Vzorci so bili enkrat dnevno odvzeti iz štirih različnih fermentacij v času od 18. 11. do 19. 12. 2008 in zamrznjeni.

Druga skupina vzorcev predstavlja pet steklenic vin, ki so izkazovali senzorično napako. Prejeli smo jih iz Kmetijskega inštituta Slovenije.

#### 3.1.3 Mikrobiološka gojišča

V eksperimentalnem delu smo uporabili trdno in tekoče gojišče YPD ter trdno gojišče WL.

- Tekoče gojišče YPD (Merck, Nemčija)

Tekoče gojišče YPD smo uporabljali za submerzno namnoževanje kvasovk na stresalniku. Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca pri čemer smo natehtali ustrezno količino gojišča v 750 mL destilirane vode in ga sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 1,1 atm, 15 min). Gojišče smo po avtoklaviranju ohladili in ga aseptično razdelili v erlenmajerice.

- Trdno gojišče YPD (Merck, Nemčija)

V 750 mL destilirane vode smo natehtali ustrezno količino gojišča YPD in dodali 2 % agarja. Sestavine smo raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Gojišče smo

sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 1,1 atm, 15 min), in ga ohlajenega razdelili v petrijeve plošče. Trdno gojišče YPD smo uporabljali za namnoževanje in hranjene kvasovk na petrijevih ploščah v inkubatorju pri 28 °C.

- Trdno gojišče WL (ang. Wallerstein Laboratories Nutrient agar)

Po navodilih proizvajalca smo natehtali ustrezno količino gojišča WL v 750 mL destilirane vode in sestavine raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 1,1 atm, 15 min), ga ohladili na 45 °C in ga razdelili v petrijeve plošče. WL agar je diferencialno gojišče, ki se ga uporablja za ločevanje med kvasovkami iz rodu *Saccharomyces* in kvasovkami, ki niso iz tega rodu (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Uporabili smo ga za določanje CFU.

#### 3.1.4 Pufri in raztopine

- Pufer TE (Boom in sod., 1990)

Tris-HCl        10 mM

EDTA         1 mM

- Pufer TES (Raspor in sod., 2001)

Tris-HCl       100 mM

EDTA         10 mM

SDS           2 %

- 50 × TAE pufer pH = 8,5 (Raspor in sod., 2001)

Tris baza      242 g

Na<sub>2</sub>EDTA × 2 H<sub>2</sub>O 37 g

očetna kislina 57,1 mL

do 1 L destilirane vode

- Pufer 1 × PBS (pH = 7,4) (Dulbecco in Vogt, 1954)

NaCl           137 mM

KCl            2,7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>      10 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>      1,76mM

- Zimolazni pufer (Guiver in sod., 2001)

Sorbitol        1M

NaEDTA       0,1 mM

β-merkaptetoetanol 14mM

- Nanašalni pufer (Fermentas, Litva)

- Raztopina etidijevega bromida (Sigma, ZDA)

Etidijev bromid    5 µg/mL

### 3.1.5 Komerercialni kompleti

**Preglednica 2: Komerercialni kompleti za izolacijo DNK in izvedbo PCR v realnem času**

| Komerercialni komplet                                | Opis                                               | Proizvajalec                   |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------|
| PureLink <sup>®</sup> Genomic DNA Kits               | Komplet za izolacijo genomske DNK                  | Invitrogen, ZDA                |
| DNA Isolation Kit for Cells and Tissues <sup>®</sup> | Komplet za izolacijo genomske DNK iz celic in tkiv | Roche, Nemčija                 |
| MasterPure <sup>®</sup> Yeast DNA Purification Kit   | Komplet za izolacijo genomske DNK kvasovk          | Epicentre Biotechnologies, ZDA |
| DNeasy <sup>®</sup> Blood & Tissue Kit               | Komplet za izolacijo genomske DNK iz krvi in tkiv  | Qiagen, Nizozemska             |
| SYBR <sup>®</sup> Green RT PCR Kit                   | Komplet za PCR v realnem času                      | Qiagen, Nizozemska             |

### 3.1.6 Nukleotidi in encimi

- Nukleotidi

dNTP set (Sigma, ZDA)

100 bp lestvica DNA (Fermentas, Litva)

1 kb lestvica DNA (Fermentas, Litva)

- Oligonukleotidni začetniki

**Preglednica 3: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki**

| Ime          | Zaporedje                             | Avtor in proizvajalec                     |
|--------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|
| ITS1         | 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'             | (White in sod., 1990)<br>Sigma, ZDA       |
| ITS4         | 3'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-5'            | (White in sod., 1990)<br>Sigma, ZDA       |
| Scerevisiae1 | 5'-ACATATGAAGTATGTTTCTATATAACGGGTG-3' | (Martorell in sod., 2005)<br>Sigma, ZDA   |
| Scerevisiae2 | 5'-TGGTGCTGGTGCGGATCTA-3'             | (Martorell in sod., 2005)<br>Sigma, ZDA   |
| ScerF        | 5'-ACTGAATTTTTGAACGCACATTG-3'         | (Hiero in sod., 2007)<br>Sigma, ZDA       |
| ScerR        | 5'-CGCAGAGAAACCTCTCTTTGGA-3'          | (Hiero in sod., 2007)<br>Sigma, ZDA       |
| Brett1       | 5'-GTTACACAAATCCCCTCGATCAAC-3'        | (Tessonnière in sod., 2009)<br>Sigma, ZDA |
| Brett2       | 5'-TGCCAACCTGCCGAATGTTCTC-3'          | (Tessonnière in sod., 2009)<br>Sigma, ZDA |
| DBRUXF       | 5'-GGATGGGTGCACCTGGTTTACAC-3'         | (Phister in Mills, 2003)<br>Sigma, ZDA    |
| DBRUXR       | 5'-TGGTGCTGGTGCGGATCTA-3'             | (Phister in Mills, 2003)<br>Sigma, ZDA    |

- Encimi

RNaza (Sigma, ZDA)

Proteinaza K (Roche, Nemčija)

DNA polimeraza *Taq* (Promega, ZDA)

### 3.1.7 Druge spojine

Etidijev bromid (Sigma, ZDA)

Agaroz (Sigma, ZDA)

Etanol (96 %, 70 %) (Merck, Nemčija)

MgCl<sub>2</sub> (Promega, ZDA)

Amonijev acetat (Merck, Nemčija)

### 3.1.8 Oprema

**Preglednica 4: Laboratorijska oprema**

| Naziv                            | Oznaka modela                   | Proizvajalec               |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| Aparatura PCR                    | GeneAmp DNA Thermal Cycler 2400 | Perkin-Elmer, ZDA          |
| Aparatura PCR                    | iCycler                         | Bio-Rad, ZDA               |
| Aparatura Real Time PCR          | Real Time PCR 7500              | Applied Biosystems, ZDA    |
| Avtoklav, mali                   | /                               | PBI International, Italija |
| Avtomatske pipete                | P2, P20, P10, P100, P200, P1000 | Gilson, Francija           |
| Centrifuga                       | 5451C                           | Eppendorf, Nemčija         |
| Centrifuga                       | 3K30                            | Sigma, ZDA                 |
| Digestorij                       | /                               | Iskra, Slovenija           |
| Dokumentacijski sistem za gele   | GelDoc 200                      | BIO RAD, ZDA               |
| Hladilnik                        | /                               | Gorenje, Slovenija         |
| Inkubator                        | BTES-frigomat                   | Termo Iskra, Slovenija     |
| Laminarij                        | PIO SMBC 122 VA                 | Iskra, Slovenija           |
| Ledomat                          | N30                             | Icematic, Italija          |
| Mikroskop, invertni              | Leica DMLB                      | Leica, Nemčija             |
| Mikrovalovna pečica              | TurboChef                       | Candy, Italija             |
| NanoDrop                         | NanoDrop 1000                   | NanoDrop Technologies, ZDA |
| Napajalnik za elektroforezo      | MINI-protean 3 Cell             | BioRad, ZDA                |
| Stresalnik                       | Ceromat U                       | B-Braun, Nemčija           |
| Tehtnica                         | Exacta                          | Tehtnica, Slovenija        |
| Termostat s cirkulacijo tekočine | 2219 Multitemp II               | LKB-Pharmacia, ZDA         |
| Vakuumska črpalka                | UNIVAPO 100H                    | Uniequip, Nemčija          |
| Vrtinčnik                        | Vibromix 104 EV                 | Tehtnica, Slovenija        |
| Zamrzovalnik (-20 °C)            | Economic                        | Gorenje, Slovenija         |

Poleg opreme navedene v razpredelnici smo uporabili še: nastavke za pipete (2 µL, 10 µL, 100 µL, 300 µL in 1000 µL), mikrocentrifugirke, čaše, merilne valje, infuzijske steklenice (50 mL, 150 mL in 500 mL), epruvete, merilne bučke, mikropestile, aluminijasto folijo, kadičke za elektroforezo, erlenmajerice, cepilne zanke, filtre, šteвне ploščice Bürker-Türk, objektna in krovna stekelca, 96-mestne mikrotitrne plošče, paličico po Drigalskem, steklene kroglice, steklene palčke, pincete, kovinske žlice ter petrijevke.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izbira najprimernejše tehnike izolacije DNK

Prvi del eksperimenta je zajemal izolacijo DNK iz čistih kultur z različnimi tehnikami izolacije. Uspešnost posameznih tehnik smo preverili z gelsko elektroforezo in na podlagi uspešnosti, hitrosti in enostavnosti izbrali najprimernejšo. Izbrano tehniko smo uporabili v nadaljnjih stopnjah eksperimenta.

Med seboj smo primerjali naslednje tehnike izolacije DNK: izolacija s peskom, izolacija z uporabo kita PureLink® (Invitrogen, ZDA), izolacija z uporabo kita MasterPure® (Epicentre Biotechnologies, ZDA), izolacija z uporabo kompleta DNA Isolation Kit for Cells and Tissues® (Roche, Nemčija), ter izolacija z uporabo kita DNeasy® (Qiagen, Nizozemska). Pri izolaciji DNK s kitoma PureLink® in DNeasy® je bila potrebna predhodna liza celic. Za ta namen smo uporabili dve različni metodi: mehanska liza celic z uporabo peska, ter encimska liza celic z uporabo encima litikaze. Tako smo pri teh dveh tehnikah dobili dve različici posamezne tehnike, ki smo ju prav tako primerjali z ostalimi.

DNK smo izolirali iz sevov *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927, *Dekkera bruxellensis* ZIM 701 in nitaste glive *Aspergillus oryzae*. Izolacijo pri tehnikah, ki vključujejo uporabo kita smo izvedli po navodilih proizvajalca, med tem ko smo izolacijo s peskom izvedli po protokolu, ki so ga leta 1992 opisali Möller in sodelavci.

#### 3.2.1.1 Izolacija DNK s peskom (Möller in sod., 1992)

V mikrocentrifugirko s približno 100 µL sterilnega kremenčevega peska smo prenesli polno zanko kulture in jo strli z mikropestilom. Dodali smo 150 µL TES pufra s proteinazo K, premešali na vrtničniku in inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi od 55 do 60 °C 30 minut. Po končani inkubaciji smo v mikrocentrifugirko dodali 150 µL 5M NaCl in 65 µL CTAB/NaCl, premešali in 10 minut inkubirali pri 65 °C. Po zaključku inkubacije smo v mikrocentrifugirko dodali 700 µL kloroform:izoamilalkohola, postavili v ledeno kopel in inkubirali 30 minut. Mikrocentrifugirke smo centrifugirali 10 minut pri 14.000 obratih/min in 4 °C. Po centrifugiranju smo prenesli približno 500 µL supernatanta v novo mikrocentrifugirko, v katero smo pred tem dodali 225 µL 5M amonijevega acetata. Ponovno smo inkubirali v ledeni kopeli 30 minut. Po končani inkubaciji smo ponovili centrifugiranje pri enakih pogojih (10 min, 14.000 obr./min, 4 °C). V novo mikrocentrifugirko z 700 µL izopropanola smo prenesli 580 µL supernatanta. Vsebinsko mikrocentrifugirke premešali s počasni obračanjem in nato inkubirali na ledu 10 minut. Ponovno smo centrifugirali (10 min, 14.000 obr./min, 4 °C) in po zaključku odlili supernatant, pelet pa resuspendirali v 900 µL hladnega 70 % etanola. Z obračanjem smo premešali vsebinsko mikrocentrifugirke in centrifugirali 10 minut, pri 14.000 obratih/min in

sobni temperaturi. Nato smo previdno odlili etanol in osušili DNK v vakuumski črpalki pri 300 obr./min 10 minut. DNK smo raztopili v 100  $\mu$ L TE pufra, dodali 1  $\mu$ L RNaze in inkubirali pri 37 °C. Po zaključku inkubacije smo RNazo odstranili iz raztopine. To smo storili tako, da smo v raztopino dodali 900  $\mu$ L 70 % etanola, dobro premešali z obračanjem in centrifugirali 10 minut pri 14.000 obr/min pri sobni temperaturi. Previdno smo odlili supernatant in pelet osušili na zraku. Nato smo dodali 35  $\mu$ L TE pufra in pelet resuspendirali.

### 3.2.1.2 Izolacija DNK s komercialnim kompletom PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, 2007)

Za izolacijo DNK iz kvasovk s kompletom PureLink® Genomic DNA Kits je potrebna predhodna liza celic. Izolacijo DNK s tem kompletom smo izvedli v dveh različicah. V prvi različici smo za lizo uporabili zimolazni pufer, kot je v primeru izolacije DNK iz kvasovk navedeno v navodilih proizvajalca. Suspenzijo celic smo centrifugirali 5 minut pri 5.000 obratih/min. Odlili smo medij in pelet resuspendirali v 500  $\mu$ L zimolaznega pufra. Dodali smo 15 enot zimolaze in inkubirali 1 uro pri 37 °C. Centrifugirali smo 10 minut pri 12.000 obr./min pri sobni temperaturi. V drugi različici smo celice lizirali s sterilnim kremenčevim peskom. To smo storili tako, da smo v mikrocentrifugirko s sterilnim kremenčevim peskom, z mikropestilom prenesli kulturo in dobro premešali. Dodali smo 500  $\mu$ L zimolaznega pufra in počakali, da je pesek sedimentiral. Odpipetirali smo raztopino nad peskom v novo mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 12.000 obr./min pri sobni temperaturi. Od centrifugiranja dalje je postopek izolacije DNK enak pri obeh različicah. Po zaključku centrifugiranja smo supernatant odlili in pelet resuspendirali v 180  $\mu$ L raztopine »PureLink® Genomic Digestion Buffer«. V raztopino smo dodali 20  $\mu$ L proteinaze K, premešali na vrtinčniku in inkubirali 45 minut pri 55 °C. Po zaključku inkubacije smo dodali 20  $\mu$ L RNaze A, ponovno premešali na vrtinčniku in inkubirali 2 minuti na sobni temperaturi. Dodali smo 200  $\mu$ L raztopine »PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer«, na kratko premešali na vrtinčniku, dodali 200  $\mu$ L 96 % etanola in ponovno premešali. Sledila je vezava DNK, ki smo jo izvedli tako, da smo pripravljen lizat prenesli v kolono »PureLink® Spin Column«, ki smo jo predhodno namestili v mikrocentrifugirko priloženo kompletu. Vse skupaj smo centrifugirali 1 minuto pri 14.000 obratih/min. Po centrifugiranju smo uporabljeno mikrocentrifugirko zavrgli in kolono prenesli v svežo mikrocentrifugirko. V kolono smo nato dodali 500  $\mu$ L raztopine »PureLink® Wash Buffer 1« in centrifugirali 1 minuto pri 14.000 obr./min. Ponovno smo nadomestili uporabljeno mikrocentrifugirko z novo in v kolono dodali 500  $\mu$ L raztopine »PureLink® Wash Buffer 2«. Centrifugirali smo 3 minute pri 14.000 obratih/min. Zavrgli smo uporabljeno mikrocentrifugirko in jo ponovno nadomestili s svežo. Eluirali smo DNK tako, da smo v kolono dodali 50  $\mu$ L raztopine »PureLink® Genomic Elution Buffer«, inkubirali na sobni temperaturi 1 minuto in nato 1 minuto centrifugirali pri 14.000 obr./min pri sobni temperaturi. Kolono smo odstranili iz mikrocentrifugirke in jo zavrgli, v mikrocentrifugirki se je nahajala izolirana DNK.

### 3.2.1.3 Izolacija DNK s komercialnim kompletom MasterPure® Yeast DNA Purification Kit (Jin in sod., 2004)

Kulturo v tekočem mediju smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in centrifugirali pri 10.000 obr/min 2 do 5 minut. Previdno smo odlili supernatant, dodali 300 µL raztopine »Yeast Cell Lysis Solution«, celice resuspendirali z mešanjem na vrtinčniku in inkubirali v vodni kopeli 15 minut pri 65 °C. Po zaključku inkubacije smo mikrocentrifugirko prenesli v ledeno kopel in inkubirali 5 minut. Nato smo v mikrocentrifugirko dodali 150 µL raztopine »Protein Precipitation Reagent«, premešali na vrtinčniku in centrifugirali 10 minut pri 10.000 obr./min. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 500 µL izopropanola in premešali z obračanjem. Ponovno smo centrifugirali pri enakih pogojih kot pred tem, nato smo odpipetirali supernatant in ga zavrgli. Pelet smo sprali s 70 % etanolom, ki smo ga nato odpipetirali in zavrgli. Vzorec smo na kratko centrifugirali in s pipeto previdno odstranili preostali etanol. DNK smo resuspendirali v 35 µL TE pufra, dodali 1 µL RNaze in inkubirali pri 37 °C. Po zaključku inkubacije smo RNazo odstranili iz raztopine. To smo storili tako, da smo v raztopino dodali 900 µL 70 % etanola, dobro premešali z obračanjem in centrifugirali 10 minut pri 14.000 obr/min pri sobni temperaturi. Previdno smo odlili supernatant in pelet osušili na zraku. Nato smo dodali 35 µL TE pufra in pelet v njem resuspendirali.

### 3.2.1.4 Izolacija DNK s komercialnim kompletom DNA Isolation Kit for Cells and Tissues® (Roche, 2010)

V mikrocentrifugirko s sterilnim kremenčevim peskom smo prenesli kulturo in z mikropestilom dobro premešali. Dodali smo 1200 µL raztopine »Cell Lysis Buffer« in premešali na vrtinčniku. Dodali smo 10 µL proteinaze K, ponovno premešali na vrtinčniku in inkubirali v vodni kopeli 2 uri pri 65 °C. Po inkubaciji smo v mikrocentrifugirko dodali 5 µL raztopine »RNaze Solution«, premešali in inkubirali 15 minut na 37 °C. Nato smo dodali 600 µL raztopine »Protein Precipitation Solution«, temeljito premešali na vrtinčniku in vzorec inkubirali v ledeni kopeli 5 minut. Vzorec smo nato centrifugirali pri 15.000 obratih/min in po zaključku supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo 0,7-kratni volumen izopropanola ter mešali z obračanjem, dokler se zgornja in spodnja faza nista pomešali. Centrifugirali smo 10 minut pri 2.500 obratih/min, po zaključku previdno odpipetirali supernatant in ga zavrgli. V mikrocentrifugirko s peletom smo dodali 1 mL hladnega 70 % etanola, ponovno centrifugirali pri enakih pogojih kot pred tem in po zaključku previdno odlili etanol. Pelet z izolirano DNK smo osušili na zraku ali v vakuumski centrifugi. Pelet smo resuspendirali v 100 µL TE pufra.

### 3.2.1.5 Izolacija DNK s komercialnim kompletom DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, 2006)

Tudi pri tej metodi izolacije DNK je potrebna predhodna liza celic. To smo storili na dva različna načina, in sicer s sterilnim kremenčevim peskom in z encimsko lizo, tako smo dobili dve različici metode. Pri prvi različici smo kulturo z mikropestilom prenesli v mikrocentrifugirko s sterilnim kremenčevim peskom in jo homogenizirali z vrtenjem mikropestile. Dodali smo 400 µL raztopine »Buffer AL« in 40 µL proteinaze K, premešali na vrtinčniku, dodali 200 µL 96 % etanola in ponovno premešali. S pipeto smo prenesli mešanico v kolono »DNeasy Mini Spin« nameščeno na zbiralniku. Centrifugirali smo 1

min pri 8.000 obr./min, zavrgli zbiralnik skupaj z vsebino in prenesli kolono v nov zbiralnik. V kolono smo dodali 500 µL raztopine »Buffer AW2«, centrifugirali 3 minute pri 14.000 obr./min in ponovno zavrgli zbiralnik z vsebino. Kolono smo tokrat prenesli v sterilno mikrocentrifugirko in dodali 200 µL raztopine »Buffer AE«, inkubirali 1 min pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 min pri 8.000 obr./min. Kolono smo po končanem centrifugiranju zavrgli in shranili mikrocentrifugirko z izolirano DNK. Pri drugi različici smo suspenzijo celic najprej 3 min centrifugirali pri 6.000 obr./min in nato odlili medij. Pelet smo resuspendirali v 500 µL zimolaznega pufra in dodali 5 µL zimolaze. Inkubirali smo 1 uro pri 37 °C, centrifugirali 10 minut pri 12.000 obr./min in odlili supernatant. Od tu naprej je bil postopek enak kot pri metodi z lizo celic s kremenčevim peskom, in sicer od koraka kjer smo dodali 400 µL raztopine »Buffer AL«.

### 3.2.2 Postavitev metode za določanje števila kvasovk vrst *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* z uporabo PCR v realnem času

Postavitev metode za določanje števila kvasovk z uporabo PCR v realnem času je potekala v več delih. Najprej smo kulturo namnožili v tekočem gojišču in z uporabo tehnike štetja po Bürker-Türku določili število mikroorganizmov v vzorcu. Na podlagi te določitve smo izolirali DNK iz določene koncentracije mikroorganizmov, ki je bila v našem primeru  $1 \times 10^7$  celic / mL.

V drugem delu smo izvedli klasični PCR s štirimi različnimi pari začetnih oligonukleotidov. Preizkusili smo dva para začetnikov specifična za *Saccharomyces cerevisiae*, in dva para specifična za *Dekkera bruxellensis*. Na podlagi rezultatov klasičnega PCR smo za vsako vrsto izbrali en par oligonukleotidnih začetnikov, ki se je izkazal kot bolj uspešen, in ga uporabili v nadaljevanju poskusa.

Sledila je optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov. To smo naredili tako, da smo reakcijo PCR v realnem času izvedli v več ponovitvah, pri čemer je bila edina spremenljivka koncentracija oligonukleotidnih začetnikov. Namen tega je, da določimo najustreznejšo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov, ki zagotavlja dovolj visoko občutljivost metode in tvori najmanj nukleotidnih dimerov in nespecifičnih produktov.

V zadnjem delu postavitve metode smo naredili umeritveno krivuljo za določanje števila kvasovk v realnih vzorcih. To smo naredili tako, da smo izolirano DNK iz znanega števila kvasovk redčili po Kochu in s posameznimi redčitvami izvedli PCR v realnem času.

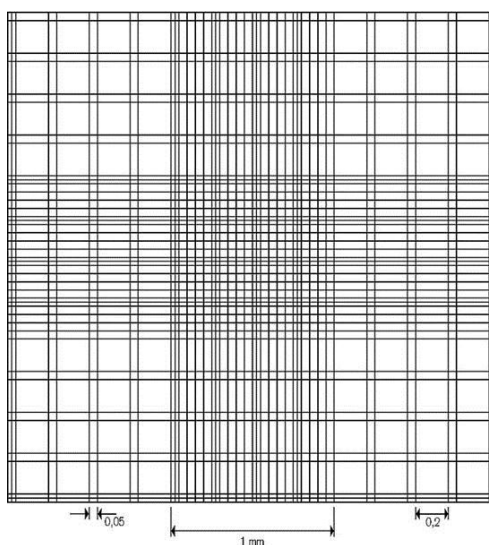
#### 3.2.2.1 Namnožitev kulture ter posredno in neposredno določanje koncentracije mikroorganizmov

Kulturo smo nacepili na petrijeve plošče s trdnim gojiščem YPD agar in inkubirali 48 ur v inkubatorju pri 28 °C. Po zaključku smo kulturo iz plošče s cepilno zanko prenesli v erlenmajerico s tekočim gojiščem YPD in ponovno inkubirali 48 ur pri 28 °C, na stresalniku pri 220 obr./min. Po zaključku inkubacije smo kulturo redčili po Kochu do ustrezne redčitve.

Nato smo s pomočjo enačbe (3) neposredno določili število celic v raztopini s štetjem pod mikroskopom z Bürker-Türkovo števno komoro (Proscitech, 2003). Epruveto z redčitvijo

$10^{-1}$  smo premešali na vrtinčniku in odpipetirali 20  $\mu\text{L}$  suspenzije celic na ustrezen prostor na števeni komori, previdno smo prekrili s krovnim stekelcem, z rahlim pritiskom odstranili odvečno tekočino in pod svetlobnim mikroskopom s 400-kratno povečavo prešteli celice v najmanj petih enakih izbranih kvadratih in izračunali povprečje. Izračunano povprečje smo nato s pomočjo enačbe 3 pretvorili v koncentracijo celic z enoto število celic /  $\mu\text{L}$ .

$$\text{št. celic} / \mu\text{L} = \frac{\text{povprečno št. celic v kvadratu}}{V \text{ kvadrata (mm}^3\text{)}} \times \text{redčitev} \quad \dots 3$$



**Slika 3: Števena ploščica po Bürker-Türku z dimenzijami za neposredno določanje števila kvasovk pod mikroskopom (Brand GmbH+Co.KG, 2010)**

Za posredno določanje števila celic z določanjem kolonijskih enot (CFU) smo nacepili na trdno gojišče WL ustrezno redčitev v treh paralelah, razmazali s paličico po Drigalskem in 48 ur inkubirali pri 28 °C. Po zaključku inkubacije smo izmed nacepljenih petrijevih plošč izbrali šteвне in prešteli kolonije. Izračunali smo povprečje vzporednih vzorcev in tako dobljeno številko pomnožili z redčitvijo, rezultat je bil CFU/mL.

### 3.2.2.1 Klasični PCR in izbira oligonukleotidnih začetnikov

Klasični PCR smo izvedli z namenom izbrati ustreznejši par oligonukleotidnih začetnikov za posamezno vrsto kvasovk. Preizkusili smo oligonukleotidne začetnike Brett1/Brett2 (Tessonnière in sod., 2009) in DBRUXF/DBRUXR (Phister in Mills, 2003), specifične za *D. bruxellensis*, ter oligonukleotidne začetnike Scerevisiae1/Scerevisiae2 (Martorell in sod., 2005) in ScerF/ScerR (Hierro in sod., 2007), specifične za *S. cerevisiae*. Izmed štirih parov smo izbrali par oligonukleotidnih začetnikov specifičen za posamezno vrsto, ki se je izkazal kot najbolj učinkovit in specifičen.

Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico, tako da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali ustrezne volumne reagentov pomnožene s številom X, ki smo ga izračunali s pomočjo enačbe (4).

|                             |             |
|-----------------------------|-------------|
| PCR pufru                   | V = 4,00 µL |
| MgCl <sub>2</sub>           | V = 1,60 µL |
| dNTP                        | V = 1,60 µL |
| Oligonukleotidni začetnik 1 | V = 0,50 µL |
| Oligonukleotidni začetnik 2 | V = 0,50 µL |
| PCR H <sub>2</sub> O        | V = 9,70 µL |
| Taq polimeraza              | V = 0,10 µL |

Zato smo v PCR mikrocentrifugirke razdelili po 18 µL reakcijske mešanice in dodali 2 µL DNK, izolirane iz posameznega vzorca in postavili na držalo v PCR aparaturi. Izvedli smo klasični PCR po ustreznem programu.

Po končani reakciji je sledilo preverjanje rezultatov pomnoževanja z agarozno gelsko elektroforezo. To smo storili tako, da smo 8 µL posameznega vzorca zmešali z 2 µL nanašalnega pufru in mešanico nanesli na 1,5 % agarozni gel v pufru TAE. Na gel smo nanesli še 100 bp lestvico DNA. Elektroforeza je potekala 1 uro pri konstantni napetosti 150V. Pokončani elektroforezi smo gel 10 minut barvali v raztopini EtBr, ga nato opazovali pod UV svetlobo in računalniško dokumentirali.

### 3.2.2.2 Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov

Optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov smo izvedli s tremi različnimi oligonukleotidnimi začetniki od katerih sta bila dva specifična za vrsto *Saccharomyces cerevisiae*, tretji pa za vrsto *Dekkera bruxellensis*. Pri pripravi reakcijskih mešanic torej uporabimo naslednje pare oligonukleotidnih začetnikov: Scerevisiae1/2 (Martorell in sod., 2005); ScerF/R (Hierro in sod., 2007) ter Brett1/2 (Tessonnière in sod., 2009). Za posamezni par začetnikov smo pripravili devet različnih reakcijskih mešanic, ki so se razlikovale v koncentraciji posameznega začetnika (preglednica 5). Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali naslednje volumne posameznih reagentov pomnožene s številom X, enačba (4).

$$X = \text{število vzorcev} + 1,5$$

...4

|                               |                      |
|-------------------------------|----------------------|
| SYBR® Green RT PCR Kit        | V = 12,5 µL          |
| PCR H <sub>2</sub> O          | V = do 23 µL         |
| Oligonukleotidni začetnik 1/2 | V (50 nM) = 0,625 µL |
|                               | V (300 nM) = 3,75 µL |
|                               | V (900 nM) = 5,4 µL  |

**Preglednica 5: Kombinacije končnih koncentracij parov oligonukleotidnih začetnikov za pripravo reakcijske mešanice za izvedbo optimizacije koncentracije oligonukleotidnih začetnikov.**

|                                  | Oligonukleotidni začetnik 2 (nM) |         |         |
|----------------------------------|----------------------------------|---------|---------|
| Oligonukleotidni začetnik 1 (nM) | 50/50                            | 300/50  | 900/50  |
|                                  | 50/300                           | 300/300 | 900/300 |
|                                  | 50/900                           | 300/900 | 900/900 |

Pripravljeno reakcijsko mešanico smo razdelili v mikrotitrsko ploščo in sicer 23 µL v posamezen prostorček na plošči, v vsakega dodali 2 µL DNK in pokrili. Mikrotitrsko ploščo smo postavili na držalo v aparaturi Real Time PCR 7500 in nastavili program PCR v realnem času. Program sestavlja denaturacija ki traja 10 minut pri 95 °C, nato sledi 40 ciklov sestavljenih iz 15 sekundne denaturacije pri 95 °C ter faze prileganja oligonukleotidov in pomnoževanja DNK, ki traja 1 min pri 60 °C. Na koncu sledi še faza denaturacije DNK, pri kateri se temperatura postopoma znižuje od 90 °C s stopnjo 0,5 °C, z zadrževalnim časom 10 sekund pri posamezni temperaturi. Rezultat so graf poteka reakcije, C<sub>q</sub> vrednosti in denuracijska krivulja, ki jih avtomatsko poda programska oprema povezana z aparaturo Real Time PCR 7500. Na podlagi pridobljenih C<sub>q</sub> vrednosti in oblike denuracijske krivulje smo določili optimalno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov, ki jo nato uporabimo pri izdelavi umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk.

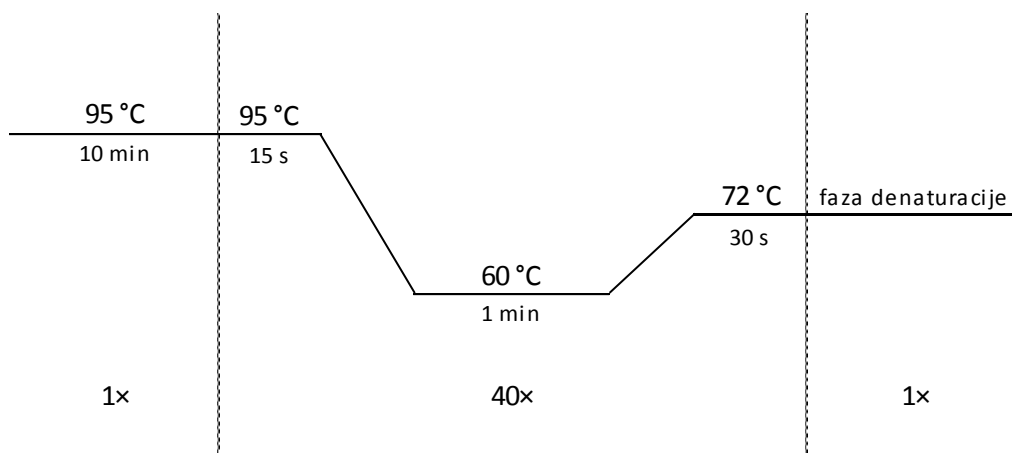
### 3.2.2.3 Izdelava umeritvene krivulje za določanje števila *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis*

Pripravili smo reakcijsko mešanico tako, da smo v mikrocentrifugirko odpipetirali spodnje ustrezne volumne reagentov pomnožene s številom X, enačba (4):

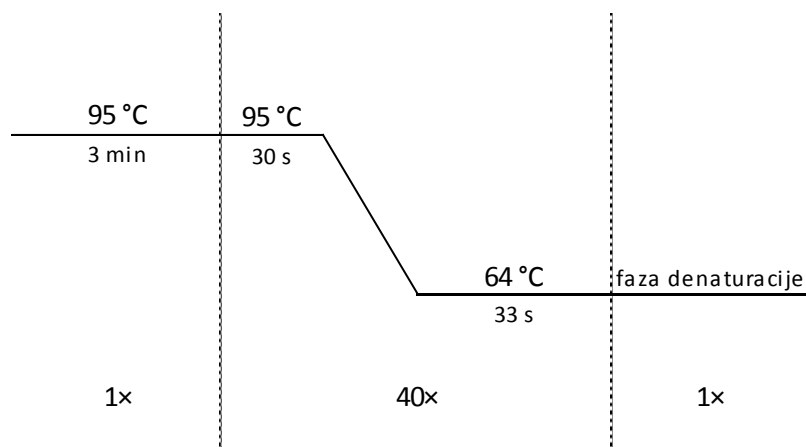
|                                      |              |
|--------------------------------------|--------------|
| SYBR® Green RT PCR Kit               | V = 12,5 µL  |
| Oligonukleotidni začetnik (c = 45nM) | V = 1,125 µL |
| Oligonukleotidni začetnik (c = 45nM) | V = 1,125 µL |
| PCR H <sub>2</sub> O                 | V = 8,25 µL  |

DNK smo izolirali iz znanega števila kvasovk ( $N = 1,0 \cdot 10^7$  celic) *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927 in *S. cerevisiae* EC-1118 (Lalvin<sup>®</sup>, Lallemend) ter *Dekkera bruxellensis* ZIM 701. Izolirano DNK smo redčili po Kochu s korakom po 1 do končne koncentracije, ki ustreza koncentraciji 1 celice. V mikrotitrsko ploščico smo razdelili 23  $\mu\text{L}$  reakcijske mešanice in dodali 2  $\mu\text{L}$  DNK, in sicer vsako redčitev DNK posameznega seva v treh ponovitvah. Na koncu smo dodali še dve različni negativni kontroli. Prvo negativno kontrolo predstavlja DNK vrste za katero uporabljeni oligonukleotidni začetniki niso specifični, druga negativna kontrola pa je brez matrične DNK (NTC). Mikrotitrsko ploščico smo pokrili, prenesli na držalo v aparaturi Real Time PCR 7500 in nastavili ustrezen program PCR v realnem času, kot prikazujeta sliki 4 in 5. Rezultat PCR v realnem času so graf poteka reakcije,  $C_q$  vrednosti in denaturacijska krivulja, ki jih avtomatsko poda programska oprema povezana z aparaturo Real Time PCR 7500. Tako določene  $C_q$  vrednosti vnesemo v preglednico, izračunamo povprečje vseh treh vzporednih vzorcev, ter na podlagi dobljenih točk izrišemo linearno trendno črto s pripadajočo enačbo, ki predstavlja umeritveno krivuljo za določanje koncentracije kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v realnih vzorci. Umeritveni krivulji določimo še naklon premice - S, koeficient korelacije  $R^2$ , mejo detekcije in učinkovitost E, ki jo izračunamo iz enačbe (5).

$$E = (10^{-1/S} - 1) \times 100 \quad \dots(5)$$



Slika 4: Program PCR v realnem času za pomnoževanje DNK *S. cerevisiae* z začetniki ScerF in ScerR (Hierro in sod., 2007)



**Slika 5: Program PCR v realnem času za pomnoževanje DNK *D. bruxellensis* z začetniki Brett1 in Brett2 (Tessonnière in sod., 2009)**

### 3.2.3 Določanje števila kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* v vzorcih mošta

Izdelani umeritveni krivulji za določanje števila kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* smo nato preizkusili na realnih vzorcih. Izbrali smo dve skupini realnih vzorcev. V prvi skupini so bili zamrznjeni vzorci pravega mošta, ki smo jih prejeli iz projektnega dela Katarine Karničar. Število kvasovk v vzorcih smo, poleg metode s PCR v realnem času, določili še s klasičnimi metodami, kot so štetje po Bürker-Türku, nacepljanje redčitev na trdno gojišče in določanje CFU. Tako pridobljene rezultate smo medsebojno primerjali.

Pri vzorcih mošta gre za vzorce spontane fermentacije pravega mošta, fermentacije pravega mošta z dodanim komercialnim sevom, pravega mošta z dodano kombinacijo sevov ZIM 701 in ZIM 1927, ter pravega mošta z dodano kombinacijo seva ZIM 701 in komercialnega seva. Fermentacije so potekale 32 dni, v času od 18.11.2008 do 19.12.2008, vzorci v posameznih fermentorjih so bili odvzeti na določen dan fermentacije in zamrznjeni. Zamrznjene vzorce smo odtalili na sobni temperaturi in jih premešali na vrtinčniku. Odvzeli smo 20  $\mu$ L vzorca ga prenesli na števno ploščico in pod mikroskopom določili koncentracijo mikroorganizmov s štetjem po Bürker-Türku. Vzorce smo nato redčili po Kochu, s pipeto prenesli 1 mL posamezne redčitve na petrijeve plošče z gojiščem WL agar, razmazali s paličico po Drigalskem in inkubirali 48 ur pri 28 °C. Na koncu je sledila izolacija DNK. To smo storili tako, da smo 1 mL vzorca prenesli v sterilno mikrocentrifugirko in izolirali DNK s komercialnim kompletom MasterPure<sup>®</sup> Yeast DNA Purification Kit po navodilih proizvajalca (glej str. 19). Na podlagi izolirane DNK smo nato z metodo PCR v realnem času določili število *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* v vzorcih, poleg tega smo izmerili koncentracijo DNK v vzorcu z aparaturom NanoDrop 1000.

#### 3.2.3.1 Določanje števila *S. cerevisiae* v vzorcih mošta

Pripravili smo reakcijsko mešanico in jo 23  $\mu$ L razdelili na mikrotitrsko ploščico in mešanici dodali 2  $\mu$ L DNK posameznega vzorca. Na koncu smo dodali še negativno

kontrolno, in sicer DNK *D. bruxellensis* ter NTC, vsako v treh ponovitvah. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili, prenesli na držalo v aparaturi Real Time PCR 7500 in izvedli PCR v realnem času po ustreznem programu (slika 4) Rezultat so bile  $C_q$  vrednosti, ki smo jih na podlagi enačbe umeritvene krivulje pretvorili v število  $\text{Log}_{10}$  celic/mL.

#### 3.2.3.2 Določanje števila *D. bruxellensis* v vzorcih mošta

Pripravili smo reakcijsko mešanico in jo prav tako 23  $\mu\text{L}$  razdelili na mikrotitrsko ploščico, Mešanici smo dodali 2  $\mu\text{L}$  DNK posameznega vzorca. Na koncu smo dodali še negativno kontrolno, in sicer DNK *S. cerevisiae* ter NTC, vsako v treh ponovitvah. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili, prenesli na držalo v aparaturi Real Time PCR 7500 in izvedli PCR v realnem času po ustreznem programu (slika 5) Rezultat so bile  $C_q$  vrednosti, ki smo jih na podlagi enačbe umeritvene krivulje pretvorili v število  $\text{Log}_{10}$  celic/mL.

#### 3.2.3.3 Določanje koncentracije DNK z aparaturo NanoDrop 1000

Z aparaturo NanoDrop 1000 smo določali koncentracijo DNK v vzorcih. Določanje je potekalo po navodilih proizvajalca, uporabili smo 1  $\mu\text{L}$  DNK raztopljene v TE pufru izolirane iz vzorcev mošta.

### 3.2.4 Določanje števila kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* v vzorcih vina

Iz Inštituta za kmetijstvo smo prejeli pet steklenic pokvarjenih vin, ki so nam služila kot druga skupina realnih vzorcev. Ker je bila pričakovana koncentracija kvasovk v vzorcih relativno nizka, smo določali število kvasovk v 100 mL. To smo storili tako, da smo prenesli dva krat po 50 mL vsakega vzorca v sterilni centrifugirki in centrifugirali 5 minut pri 4000 obr/min. Po končanem centrifugiranju smo previdno odlili supernatant in pelet resuspendirali v preostanku medija, združili paralele in nadaljevali določanje števila kvasovk v tako pripravljenih vzorcih.

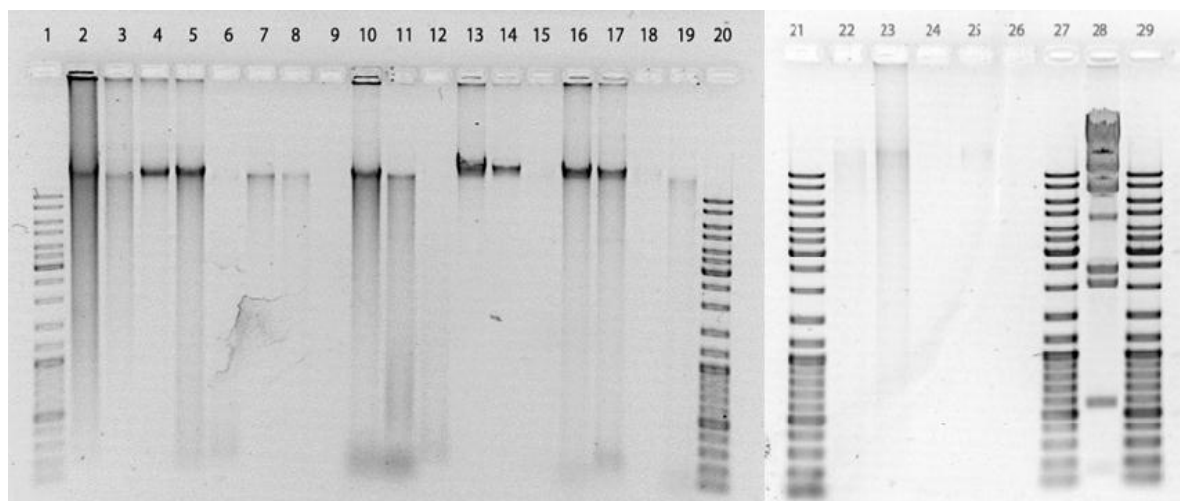
Najprej smo določili število kvasovk s štetjem pod mikroskopom po Bürker-Türku, nato smo vzorce nacepili na gojišče WL agar, inkubirali 48 ur pri temperaturi 28 °C in določili CFU. Poleg tega smo določili še CFU z membransko filtracijo. To smo storili tako da smo 100 mL posameznega vzorca vina sterilno prefiltrirali preko membranskega filtra, ki smo ga nato prenesli na gojišče WL agar in prav tako inkubirali 48 ur pri temperaturi 28 °C. Nato je sledila izolacija DNK iz vzorcev s komercialnim kompletom MasterPure® Yeast DNA Purification Kit po navodilih proizvajalca (glej str. 20). Na podlagi izolirane DNK smo nato določili število *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* z metodo PCR v realnem času po enakem postopku kot pri vzorcih mošta (glej str. 26).

## 4 REZULTATI

V tem poglavju so predstavljeni rezultati dela, ki je potekalo od konca marca 2009 do januarja 2010 v okviru ciljev eksperimentalne naloge, to so določitev najustreznejše metode izolacije DNK iz celic kvasovk, postavitve metode za določanje števila kvasovk v vzorcih mošta in vina s PCR v realnem času ter preizkus in primerjava klasičnih in sodobnih metod določanja števila kvasovk v realnih vzorcih.

### 4.1 IZBIRA NAJPRIMERNEJŠE TEHNIKE IZOLACIJE DNK

Metoda izolacije DNK mora biti enostavna, hitra in učinkovita. Poleg tega moramo upoštevati še varnost, stroške in kakovost izolirane DNK (Jara in sod., 2008). Uspešnost izolacije DNK smo preverili z uporabo agarozne gelske elektroforeze. Na podlagi rezultata smo izbrali najprimernejšo metodo izolacije DNK. Pri izbiri smo upoštevali več kriterijev. Najpomembnejši kriterij je bila uspešnost metode, ki smo jo ocenili na podlagi slike agarozne gelske elektroforeze. Poleg tega sta bila pomembna kriterija za izbiro najustreznejše metode še hitrost in enostavnost izolacije DNK.



**Slika 6: Preverjanje uspešnosti izolacije DNK kvasovk z uporabo agarozne gelske elektroforeze.**

Legenda:

- 1 - Ladder mix;
- 2 - DNK ( $c = 1 \text{ mg/mL}$ );
- 3 - DNK ( $c = 0,1 \text{ mg/mL}$ );
- 4 - Izolacija DNK s peskom, *Dekkera bruxellensis* ZIM 701;
- 5 - Izolacija DNK s peskom, *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927;
- 6 - Izolacija DNK s peskom, *Aspergillus oryzae* ZIM F21;
- 7 - Izolacija DNK s kompletom PureLink<sup>®</sup> (litikaza), *D. bruxellensis* ZIM 701;
- 8 - Izolacija DNK s kompletom PureLink<sup>®</sup> (litikaza), *S. cerevisiae* ZIM 1927;
- 9 - Izolacija DNK s kompletom PureLink<sup>®</sup> (litikaza), *A. oryzae* ZIM F21;
- 10 - Izolacija DNK s kompletom PureLink<sup>®</sup> (pesek), *D. bruxellensis* ZIM 701;
- 11 - Izolacija DNK s kompletom PureLink<sup>®</sup> (pesek), *S. cerevisiae* ZIM 1927;
- 12 - Izolacija DNK s kompletom PureLink<sup>®</sup> (pesek), *A. oryzae* ZIM F21;
- 13 - Izolacija DNK s kompletom MasterPure<sup>®</sup>, *D. bruxellensis* ZIM 701;
- 14 - Izolacija DNK s kompletom MasterPure<sup>®</sup>, *S. cerevisiae* ZIM 1927;
- 15 - Izolacija DNK s kompletom MasterPure<sup>®</sup>, *A. oryzae* ZIM F21;
- 16 - Izolacija DNK s kompletom DNA Isolation Kit for Cells and Tissues<sup>®</sup>, *D. bruxellensis* ZIM 701;

- 17 - Izolacija DNK s kompletom DNA Isolation Kit for Cells and Tissues<sup>®</sup>, *S. cerevisiae* ZIM 1927;
- 18 - Izolacija DNK s kompletom DNA Isolation Kit for Cells and Tissues<sup>®</sup>, *A. oryzae* ZIM F21;
- 19 - Izolacija DNK s kompletom DNeasy<sup>®</sup> (litikaza), *D. bruxellensis* ZIM 701;
- 20 – Ladder mix;
- 21 - Ladder mix
- 22 - Izolacija DNK s kompletom DNeasy<sup>®</sup> (litikaza), *S. cerevisiae* ZIM 1927
- 23 - Izolacija DNK s kompletom DNeasy<sup>®</sup> (litikaza), *A. oryzae*: ZIM F21;
- 24 - Izolacija DNK s kompletom DNeasy<sup>®</sup> (pesek), *D. bruxellensis* ZIM 701;
- 25 - Izolacija DNK s kompletom DNeasy<sup>®</sup> (pesek), *S. cerevisiae* ZIM 1927;
- 26 - Izolacija DNK s kompletom DNeasy<sup>®</sup> (pesek), *A. oryzae*: ZIM F21;
- 27 - Ladder mix
- 28 - Hind III
- 29 - Ladder mix

## 4.2 POSTAVITEV METODE ZA DOLOČANJE ŠTEVILA KVASOVK Z UPORABO PCR V REALNEM ČASU

### 4.2.1 Namnožitev kulture in določanje koncentracije mikroorganizmov

S štetjem pod mikroskopom s števno komoro po Bürker-Türku smo določili koncentracijo namnoženih kvasovk v tekočem gojišču YPD z namenom, da v nadaljevanju eksperimenta izoliramo DNK iz točno določene koncentracije celic. V spodnji tabeli so torej podana povprečja števila celic v kvadratih, preračunane koncentracije v izhodnih suspenzijah celic, volumni, ki smo jih prenesli naprej za izolacijo DNK in redčitve, iz katerih so bili volumni odvzeti. Namen tega je, da imamo v mikrocentrifugirki točno določeno število celic, to je  $1,0 \cdot 10^7$ , iz katerih bomo v nadaljevanju izolira DNK.

**Preglednica 6: Rezultati določanja števila kvasovk v tekočem gojišču YPD z neposrednim štetjem pod mikroskopom**

| Vrsta                  | Sevi     | Povp. št. celic na kvadrat | Izračunana koncentracija (št. celic/mL) | Volumen redčitve (da bo $c = 1,0 \times 10^7$ cel./mL) | Redčitev  |
|------------------------|----------|----------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------|
| <i>S. cerevisiae</i>   | ZIM 1927 | 8,4                        | $3,36 \cdot 10^8$                       | 300 $\mu$ L                                            | $10^{-1}$ |
| <i>D. bruxellensis</i> | ZIM 701  | 26,6                       | $1,06 \cdot 10^9$                       | 94 $\mu$ L                                             | $10^{-1}$ |
| <i>S. cerevisiae</i>   | EC-1118  | 28,03                      | $1,12 \cdot 10^8$                       | 892 $\mu$ L                                            | $10^{-1}$ |

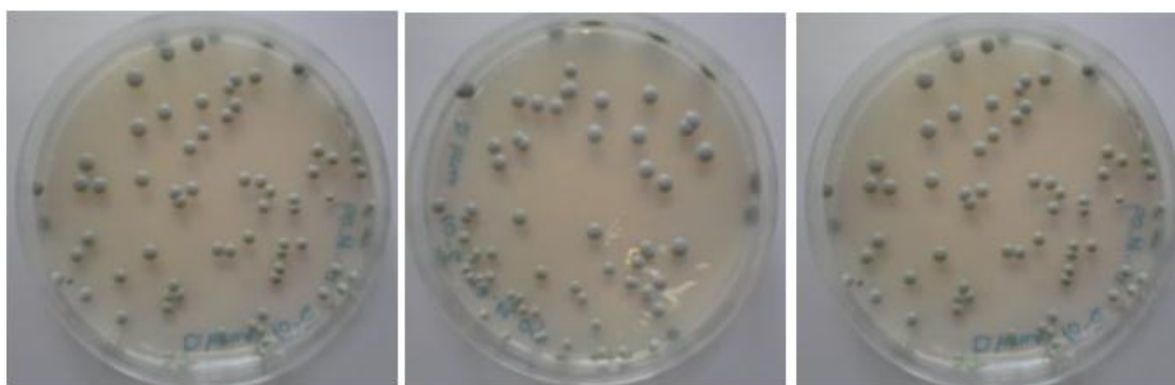
Za določanje CFU smo ustrezne redčitve v treh paralelah nacepili na gojišče WL agar in po inkubaciji izmed vseh nacepljenih plošč izbrali tiste, ki so bile števne. Prešteli smo število kolonij, izračunali povprečje vseh treh vzporednih nacepitev in število pomnožili z redčitvijo, rezultat je število CFU. Števila kolonij na posameznih ploščah, povprečje, redčitev in izračunan CFU so podani v preglednici 7.

**Preglednica 7: Rezultati nacepitve redčitev kvasovk na trdno gojišče WL agar in določanje CFU/mL**

| Vrsta                  | Sev      | Število kolonij<br>(ponovitve) |                |                | Povprečje ( $\pm$ SD) | Redčitev         | CFU/mL                 |
|------------------------|----------|--------------------------------|----------------|----------------|-----------------------|------------------|------------------------|
|                        |          | X <sub>1</sub>                 | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> |                       |                  |                        |
| <i>S. cerevisiae</i>   | ZIM 1927 | 162                            | 220            | 223            | 201,7 $\pm$ 34,4      | 10 <sup>-6</sup> | 2,02 · 10 <sup>8</sup> |
| <i>D. bruxellensis</i> | ZIM 701  | 103                            | 70             | 76             | 83 $\pm$ 17,6         | 10 <sup>-6</sup> | 8,30 · 10 <sup>7</sup> |
| <i>S. cerevisiae</i>   | EC-1118  | 131                            | 95             | 104            | 110 $\pm$ 18,7        | 10 <sup>-6</sup> | 1,10 · 10 <sup>8</sup> |



**Slika 7: Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927 redčitev 10<sup>-6</sup>, ponovitve x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub> po zaključku inkubacije na gojišču WL agar.**



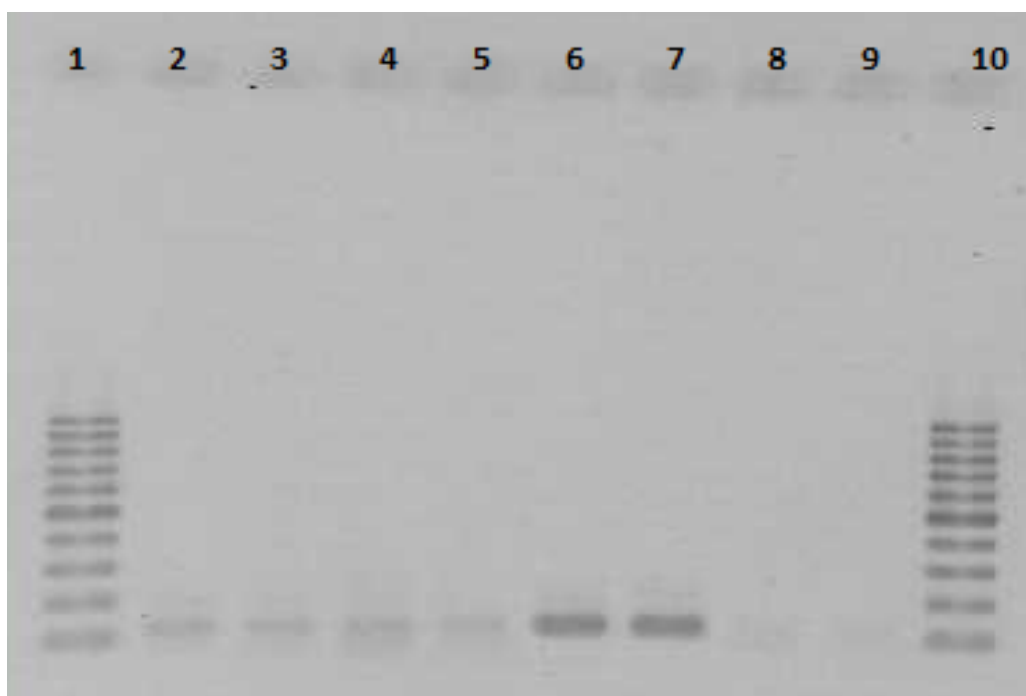
**Slika 8: Kvasovke *Dekkera bruxellensis* ZIM 701, redčitev 10<sup>-6</sup>, ponovitve x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub> na gojišču WL agar po zaključku inkubacije.**



Slika 9: Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118, redčitev  $10^{-6}$ , ponovitev  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ , po zaključku inkubacije na gojišču WL agar.

#### 4.2.2 Klasični PCR in izbira oligonukleotidnih začetnikov

Z izvedbo klasičnega PCR smo želeli določiti par oligonukleotidnih začetnikov specifičen za *S. cerevisiae* in par specifičen za *D. bruxellensis*, za nadaljnjo uporabo v poizkusu. Kriterij za izbiro para oligonukleotidnega začetnika je bila uspešnost in specifičnost izvedbe klasičnega PCR, ki smo jo določili na podlagi slike agarozne gelske elektroforeze.



Slika 10: Gelska elektroforeza produktov klasičnega PCR z oligonukleotidnimi začetniki Brett1/Brett2 in DNK izolirano iz različnih sevov ter negativna kontrola za izbiro oligonukleotidnih začetnikov za uporabo pri PCR v realnem času.

Legenda:

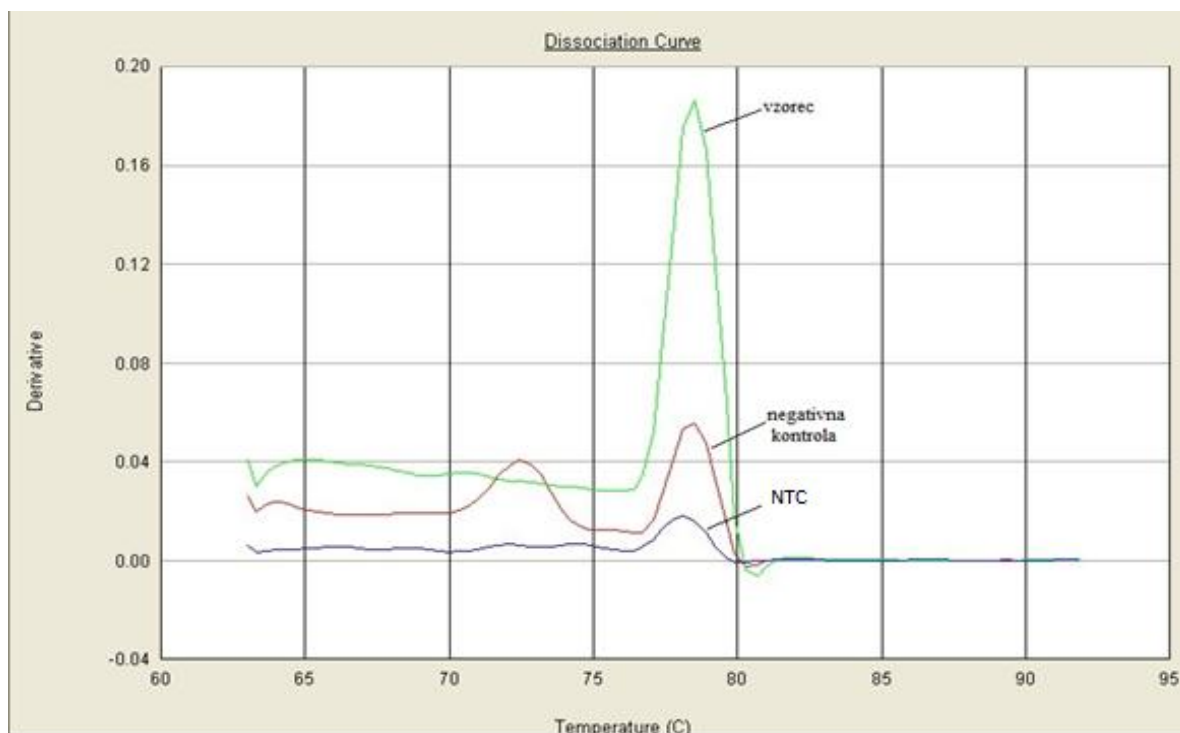
1 - 100 bp Ladder, 2 - *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927, 3 - *S. cerevisiae* ZIM 1927, 4 - *S. cerevisiae* EC-1118, 5 - *S. cerevisiae* EC-1118, 6 - *Dekkera bruxellensis* ZIM 701, 7 - *D. bruxellensis* ZIM 701, 8 - NTC, 9 - NTC, 10 - 100 bp Ladder.

#### 4.2.3 Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov

Namen optimizacije koncentracije oligonukleotidnih začetnikov je bil določiti optimalno koncentracijo nukleotidnih začetnikov ScerF/R (Hierro in sod., 2007) ter Brett1/2 (Tessonnière in sod., 2009), kar hkrati zagotavlja relativno visoko občutljivost metode in nizko koncentracijo nespecifičnih produktov in oligonukleotidnih dimerov.



Slika 11: Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov Brett1/Brett2,  $c = 50\text{nM}/50\text{nM}$ , primer poteka PCR v realnem času; os x –  $C_q$  vrednosti, os y –  $\Delta R_n$ .



**Slika 12: Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov Brett1/Brett2,  $c = 50\text{nM}/50\text{nM}$ , primer disociacijske krivulje; os x – temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), os y – derivat.**

V preglednici 8 in 9 so prikazani rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR (Hiero in sod., 2007) in Brett1/Brett2 (Tessonnière in sod., 2009). Reakcije, izvedene na podlagi DNK *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae*, smo izvedli v treh ponovitvah zato predstavljajo izračunane vrednosti  $C_q$  povprečje treh ponovitev s pripadajočimi standardnimi odkloni. Negativna kontrola NTC je bila izvedena v eni ponovitvi. Na podlagi oblike disociacijske krivulje smo za posamezno kombinacijo koncentracij oligonukleotidnih začetnikov ocenili količino nastanka oligonukleotidnih dimerov oziroma nespecifičnih produktov. Na podlagi teh rezultatov smo nato določili optimalno koncentracijo posameznega para oligonukleotidnih začetnikov za izdelavo umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk.

**Preglednica 8: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov Brett1 in Brett2**

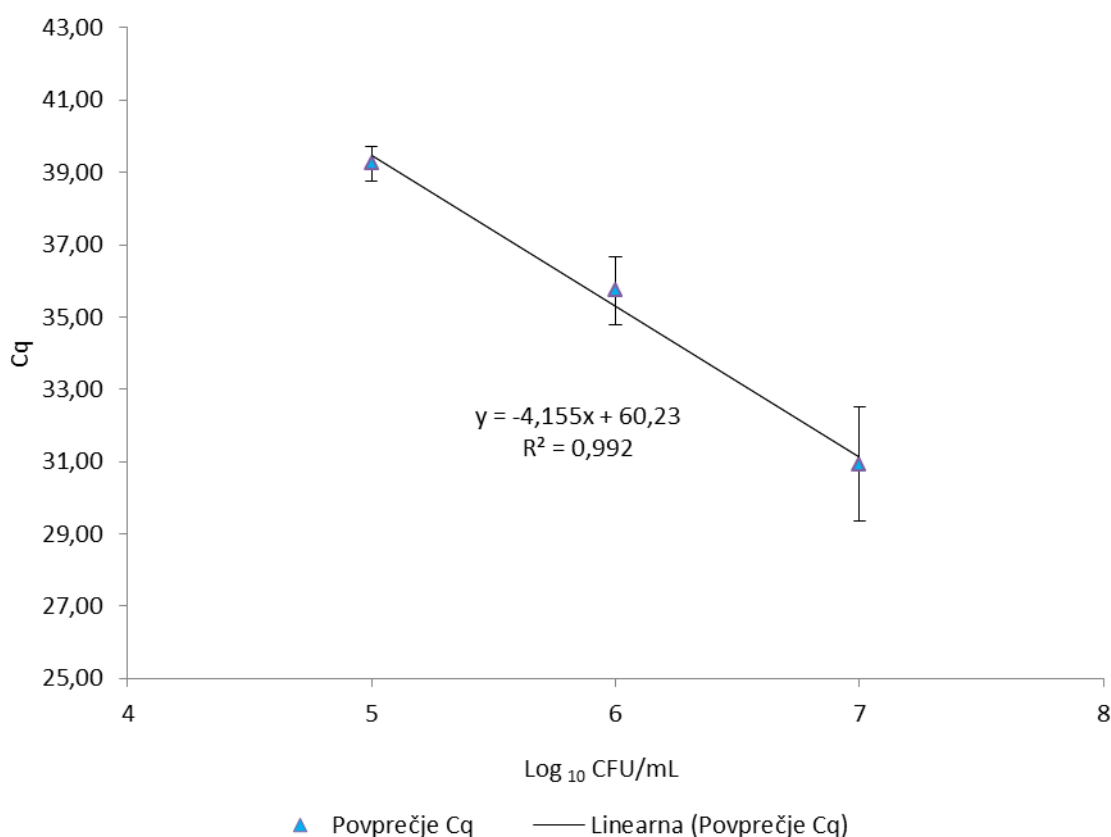
| Konc.<br>oligonukleotidnih<br>začetnikov Brett 1/2<br>(mM/mM) | $C_q \pm SD$<br><i>D. bruxellensis</i> | Negativna kontrola                   |       |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|-------|
|                                                               |                                        | $C_q \pm SD$<br><i>S. cerevisiae</i> | NTC   |
| 50/50                                                         | $20,19 \pm 0,16$                       | $38,18 \pm 1,75$                     | 39,53 |
| 50/300                                                        | $17,19 \pm 0,05$                       | $34,38 \pm 1,16$                     | /     |
| 50/900                                                        | $18,14 \pm 2,59$                       | $33,63 \pm 1,95$                     | 36,43 |
| 300/50                                                        | $18,31 \pm 0,67$                       | $34,61 \pm 1,35$                     | 37,89 |
| 300/300                                                       | $16,17 \pm 0,07$                       | $30,84 \pm 0,87$                     | 32,75 |
| 300/900                                                       | $15,62 \pm 0,34$                       | $30,15 \pm 1,31$                     | /     |
| 900/50                                                        | $18,36 \pm 0,24$                       | $33,79 \pm 0,54$                     | 37,14 |
| 900/300                                                       | $16,15 \pm 0,41$                       | $30,96 \pm 1,32$                     | 33,23 |
| 900/900                                                       | $15,70 \pm 0,46$                       | $29,22 \pm 1,08$                     | 31,16 |

**Preglednica 9: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov Scer F in Scer R**

| Koncentracija<br>začetnikov Brett<br>1/2 (nM/nM) | $C_q \pm SD$<br><i>S. cerevisiae</i> | Negativna kontrola                     |       |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|-------|
|                                                  |                                      | $C_q \pm SD$<br><i>D. bruxellensis</i> | NTC   |
| 50/50                                            | $17,91 \pm 0,62$                     | $31,24 \pm 1,05$                       | 32,12 |
| 50/300                                           | $17,26 \pm 0,09$                     | $31,24 \pm 0,27$                       | 32,73 |
| 50/900                                           | $18,67 \pm 1,58$                     | $31,34 \pm 0,46$                       | 32,51 |
| 300/50                                           | $15,51 \pm 0,21$                     | $26,52 \pm 0,47$                       | 27,16 |
| 300/300                                          | $15,21 \pm 0,16$                     | $26,74 \pm 0,59$                       | 27,26 |
| 300/900                                          | $15,44 \pm 0,48$                     | $26,56 \pm 0,48$                       | 27,49 |
| 900/50                                           | $15,16 \pm 0,03$                     | $26,29 \pm 0,20$                       | 27,35 |
| 900/300                                          | $14,98 \pm 0,07$                     | $26,25 \pm 0,23$                       | 27,34 |
| 900/900                                          | $14,94 \pm 0,06$                     | $25,98 \pm 0,19$                       | 26,89 |

#### 4.2.4 Izdelava umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk *S. cerevisiae*

Umeritveno krivuljo za določanje *Saccharomyces cerevisiae* smo izdelali z uporabo para oligonukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR v koncentraciji 45 nM, s katerim smo specifično pomnoževali gene za ribosomalno RNA, ki zajema regijo ITS2 in gen za 5.8S podenoto rRNA (Hiero in sod., 2007). Za določanje števila *S. cerevisiae*, smo izdelali dve različni umeritveni krivulji, in sicer prvo na podlagi DNK izolirane iz seva *S. cerevisiae* ZIM 1972 in drugo na podlagi DNK izolirane iz komercialnega seva *S. cerevisiae* EC-1118. DNK izolirano iz znane koncentracije *S. cerevisiae* smo redčili po Kochu do koncentracije 1 celica/mL, in nato na podlagi redčitev s pomočjo PCR v realnem času naredili umeritveno krivuljo.

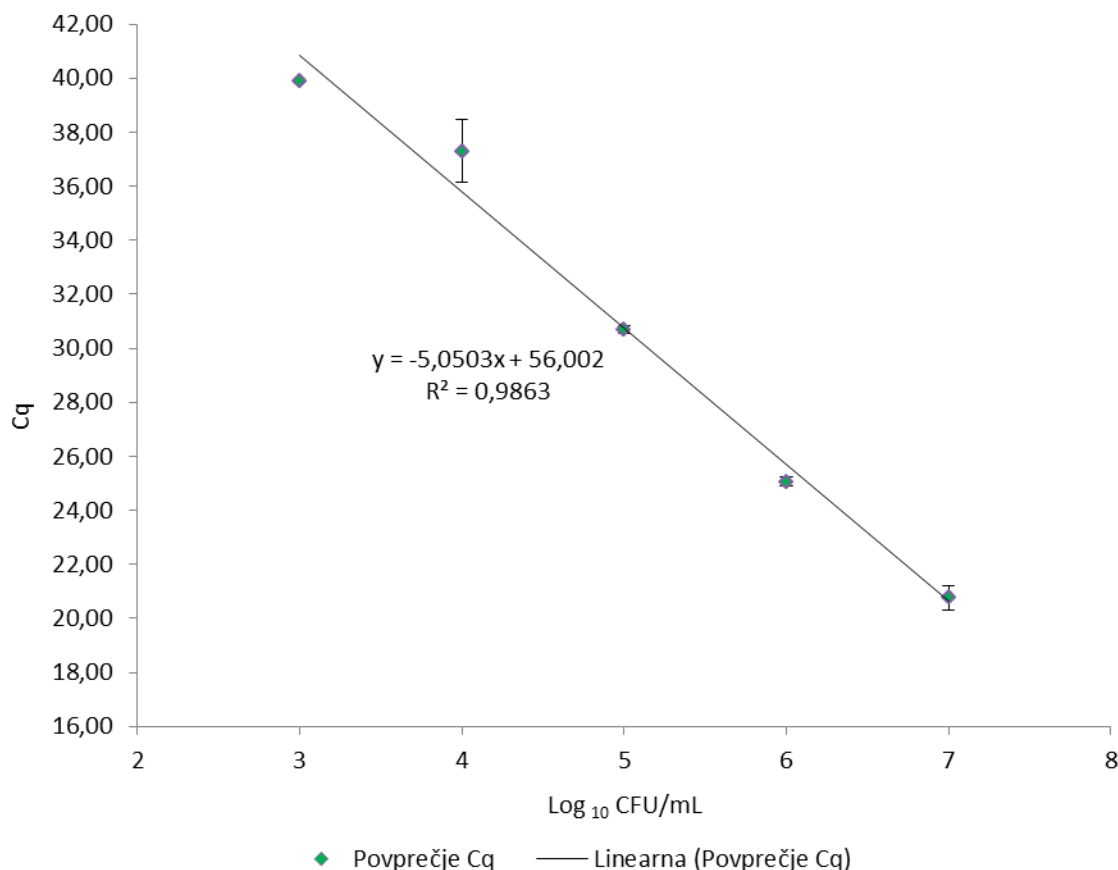


Slika 13: Umeritvena krivulja pridobljena na podlagi serijske redčitve genomske DNK *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1972; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; vrednosti so povprečje treh ponovitev.

Preglednica 10: Karakteristike umeritvene krivulje za določanje števila *Saccharomyces cerevisiae*; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; sev: *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1027

| Enačba krivulje       | Naklon krivulje k | Koeficient korelacije R <sup>2</sup> | Meja detekcije (CFU/mL)               | Učinkovitost E (%) |
|-----------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| $y = -4,155x + 60,23$ | -4,155            | 0,992                                | od 10 <sup>5</sup> do 10 <sup>7</sup> | 74,05              |

Drugo umeritveno krivuljo za določanje števila *Saccharomyces cerevisiae* smo prav tako določili z oligonukleotidnimi začetniki ScerF/ScerR v koncentraciji 45 nM/45 nM, na osnovi DNK izolirane iz komercialnega seva *S. cerevisiae* EC-1118.



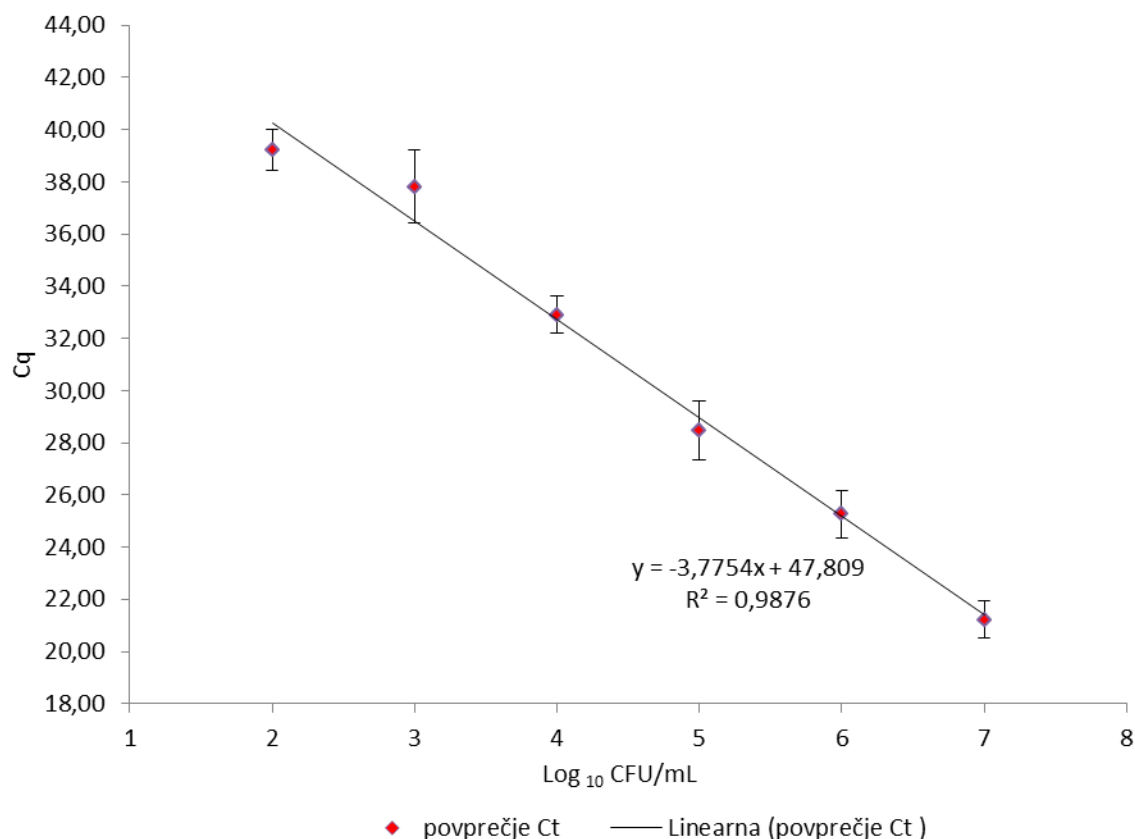
**Slika 14:** Umeritvena krivulja izdelana na podlagi serijske redčitve genomske DNK *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; vrednosti so povprečje treh ponovitev.

**Preglednica 11:** Karakteristike umeritvene krivulje za določanje števila *Saccharomyces cerevisiae*; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; sev: *S. cerevisiae* EC-1118

| Enačba krivulje         | Naklon krivulje k | Koeficient korelacije R <sup>2</sup> | Meja detekcije (CFU/mL)               | Učinkovitost E (%) |
|-------------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| $y = -5,0503x + 56,002$ | -5,0503           | 0,9863                               | od 10 <sup>3</sup> do 10 <sup>7</sup> | 57,76              |

#### 4.2.5 Izdelava umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk *D. bruxellensis*

Umeritveno krivuljo za določanje števila kvasovk *Dekkera bruxellensis* smo določili z oligonukleotidnimi začetniki Brett1/Brett2, ki specifično pomnožuje 108 baznih parov dolg odsek gena RAD4 (Tessonnière in sod., 2009).



Slika 15: Umeritvena krivulja izdelana na podlagi serijske redčitve genomske DNK *Dekkera bruxellensis* ZIM 701; začetni oligonukleotidi: Brett1/Brett2, vrednosti so povprečje treh ponovitev.

Preglednica 12: Karakteristike umeritvene krivulje za določanje števila *Dekkera bruxellensis*; začetni oligonukleotidi: Brett1/Brett2; sev: *D. bruxellensis* ZIM 701

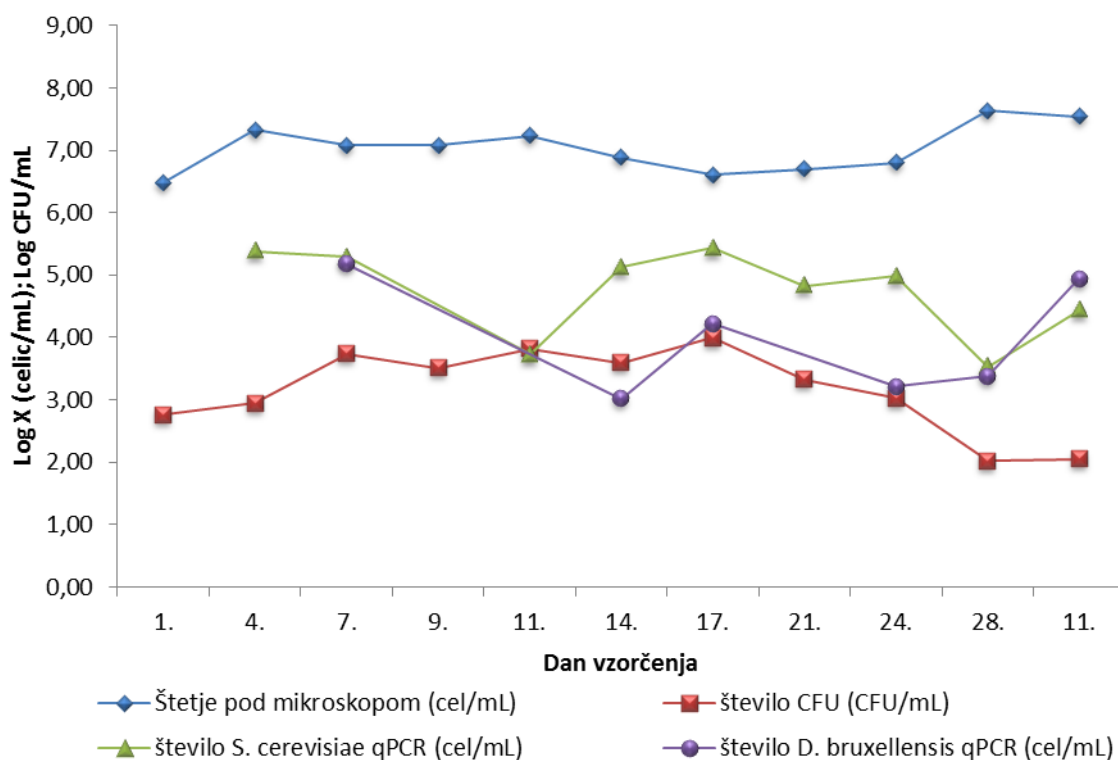
| Enačba krivulje         | Naklon krivulje k | Koeficient korelacije R <sup>2</sup> | Meja detekcije                        | Učinkovitost E (%) |
|-------------------------|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
| $y = -3,7754x + 47,809$ | -3,7754           | 0,9876                               | od 10 <sup>2</sup> do 10 <sup>7</sup> | 84,02              |

### 4.3 DOLOČANJE ŠTEVILA KVASOVK V REALNIH VZORCIH

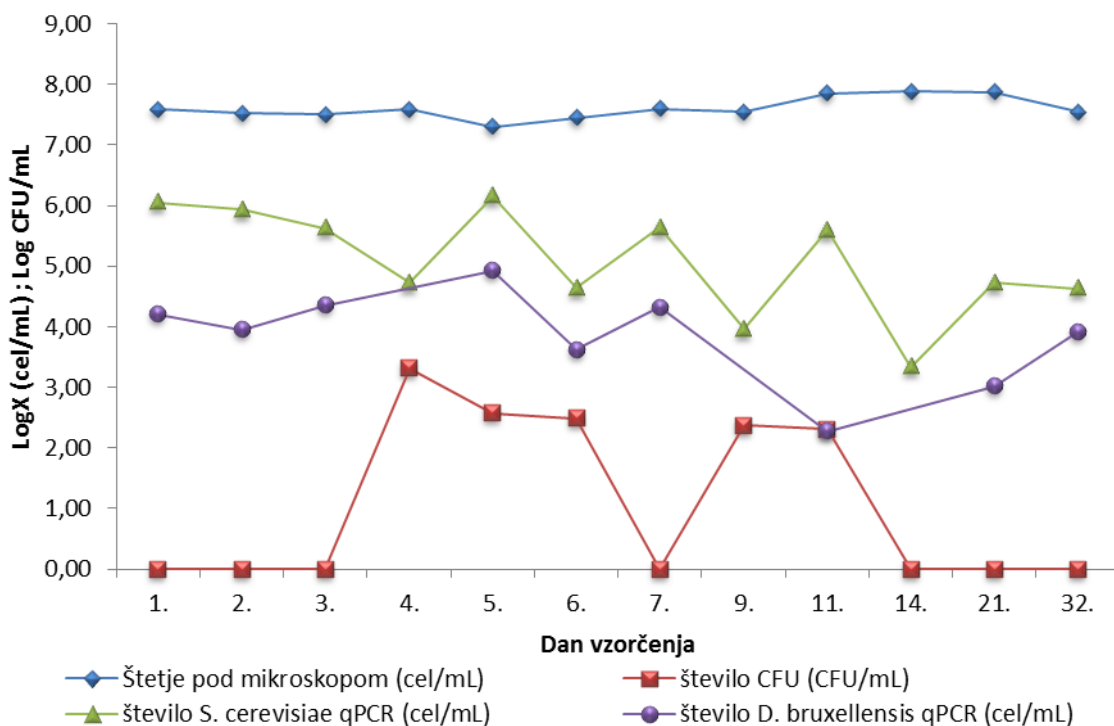
V tem delu smo izdelani umeritveni krivulji za določanje *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* preizkusili na dveh skupinah realnih vzorcev. Tako pridobljene rezultate smo primerjali z rezultati, ki smo jih pridobili s klasičnimi metodami določanja števila kvasovk. Bolj kot sama določitev točnega števila posamezne vrste kvasovk, je namen tega dela določitev, ovrednotenje in primerjava prednosti in pomanjkljivosti posamezne metode določanja števila kvasovk.

#### 4.3.1 Določanje števila kvasovk v vzorcih mošta

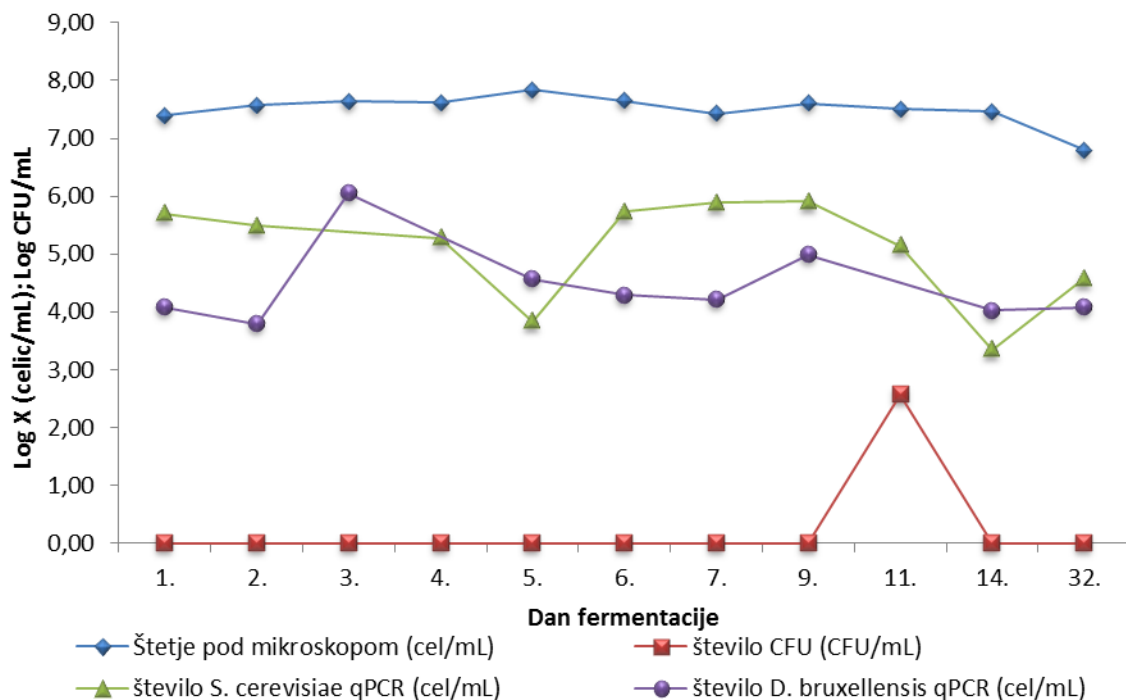
Vzorcem mošta smo določili koncentracijo kvasovk z neposrednim štetjem pod mikroskopom v števeni komori po Bürker-Türku, z nacepljanjem na trdno gojišče in določitvijo CFU, ter določanjem koncentracije kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* s PCR v realnem času. Na različne načine pridobljene rezultate smo poenotili tako, da smo vse pretvorili v  $\log_{10}$  celic/mL oziroma  $\log_{10}$  CFU/mL in rezultate prikazali v obliki grafa, kjer so na enem grafu prikazani rezultati vzorcev odvzetih iz istega fermentorja v različnih dnevih fermentacije. Vzorci so bili odvzeti ob različnih dnevih fermentacije iz štirih fermentorjev, kjer so potekale različne fermentacije: spontana fermentacija, fermentacija kjer je bil moštu dodan sev ZIM 701 in ZIM 1927, fermentacija mošta z dodanim sevom ZIM 701 in komercialni sev EC-1118, ter fermentacija kjer je bil moštu dodan samo komercialni sev EC-1118. Na štirih različnih grafih so prikazani rezultati določanja števila kvasovk z različnimi metodami v posamezni fermentaciji. Ker gre za zaporedno odvzete vzorce iz iste fermentacije, smo uporabili linearni prikaz rezultatov. Na podlagi omejitve relevantnosti umeritvene krivulje za določanje števila *D. bruxellensis* in analize disociacijske krivulje smo nekatere vzorce, ki so se prvotno izkazovali kot pozitivni, označili za negativne. Zaradi nazornejšega prikaza smo take vzorce izpustili iz grafičnega prikaza in jih nismo prikazali kot vzorce s koncentracijo 0 celic/mL.



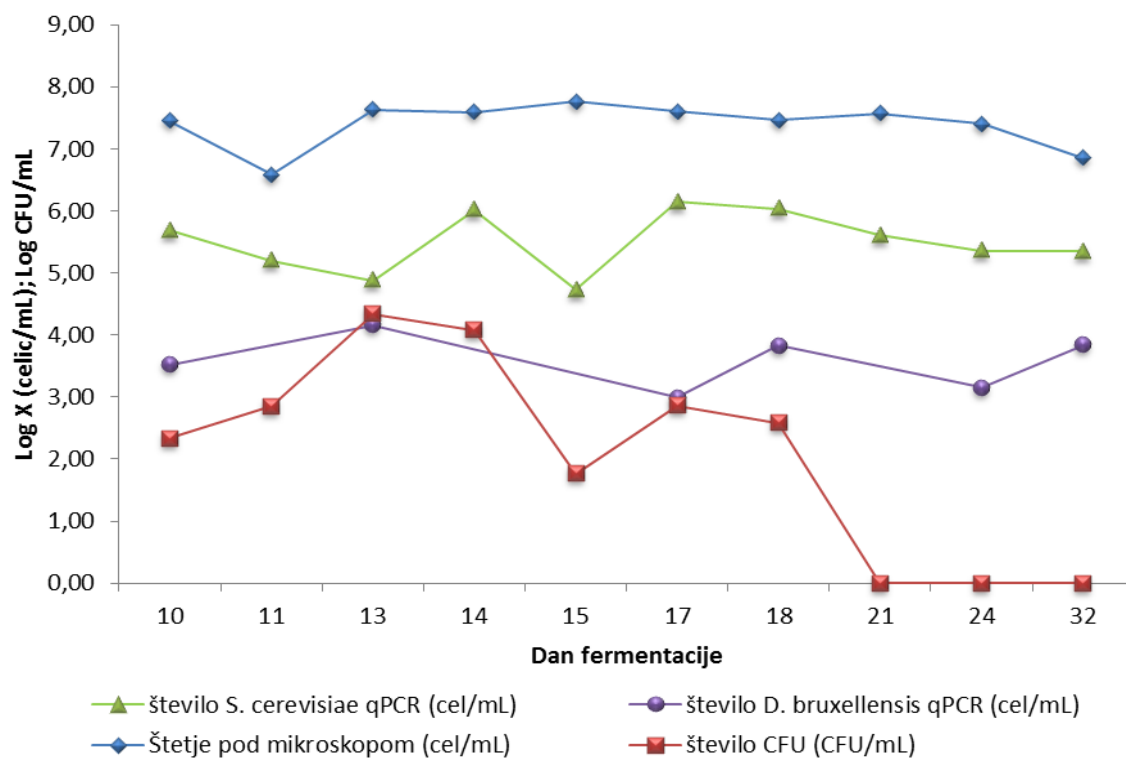
Slika 16: Dinamika spreminjanja števila kvasovk določena z različnimi metodami med spontano fermentacijo pravega mošta.



Slika 17: Dinamika spreminjanja števila kvasovk določena z različnimi metodami med fermentacijo pravega mošta z dodanima sevoma *D. bruxellensis* ZIM 701 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.



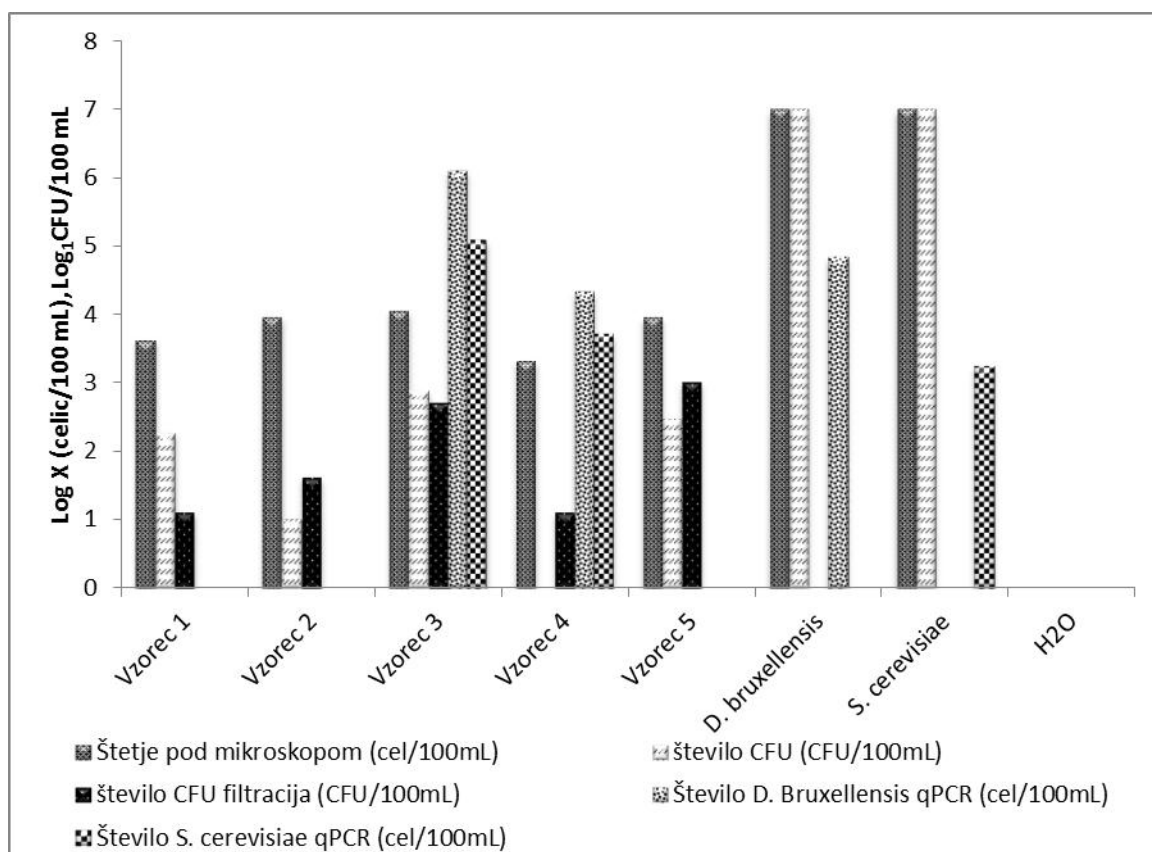
Slika 18: Dinamika spreminjanja števila kvasovk določena z različnimi metodami med fermentacijo pravega mošta z dodanima sevoma *D. bruxellensis* ZIM 701 in *S. cerevisiae* EC-1118.



Slika 19: Dinamika števila kvasovk določena z različnimi metodami med fermentacijo pravega mošta z dodanim sevom *S. cerevisiae* EC-1118.

#### 4.3.2 Določanje števila kvasovk v vzorcih vina

Petim vzorcem pokvarjenih stekleničenih vin smo določili koncentracijo kvasovk z različnimi metodami in rezultate prikazali v obliki grafa. V prikaz smo vključili tudi pozitivne in negativne kontrole z znano koncentracijo posamezne vrste kvasovk, ki so nam služili kot pomoč pri vrednotenju učinkovitosti posamezne metode. Ker je pričakovana koncentracija kvasovk v vzorcih nizka, smo določali koncentracijo kvasovk na 100 mL.



Slika 20: Določanje števila kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* z različnimi metodami v vzorcih vina z izkazano senzorično napako.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1.1 Izbira najprimernejše tehnike izolacije DNK

Uspešnost izolacije smo ocenili na podlagi jakosti signala pasov na sliki 6, kjer širši in temnejši pas pri posamezni metodi izolacije predstavlja večjo količino izolirane DNK. Na podlagi ocene uspešnosti, so se kot najuspešnejše metode izolacije DNK iz vzorcev kvasovk izkazale izolacija DNK s peskom, izolacijo DNK s komercialnim kompletom MasterPure® in izolacija DNK z uporabo komercialnega kompleta DNA Isolation Kit for Cells and Tissues®. Metoda izolacije DNK s peskom zagotavlja uspešno izolacijo, vendar je zaradi velikega števila korakov in uporabljenih reagentov zahtevnejša kot ostali dve metodi. Tudi časovno ta metoda izolacije traja veliko dlje, kot izolacija s komercialnimi kompleti. Izmed preostalih dveh metod, ki sta prav tako zagotovili uspešno izolacijo DNK iz vzorcev, smo na podlagi enostavnosti izvedbe in tudi časovnega vidika kot primernejšo določili izolacijo DNK s komercialnim kompletom MasterPure®. Izolacija s kompletom DNA Isolation Kit for Cells and Tissues® v prvem delu namreč zahteva 2-urno inkubacijo vzorca, kar pripomore k temu, da je celokupen čas izolacije s to metodo relativno dolg.

Glede na to, da mora biti metoda izolacije DNK enostavna, hitra in učinkovita (Jara in sod., 2008), smo na podlagi pridobljenih rezultatov preizkusa različnih metod izolacije izbrali metodo izolacije DNK s komercialnim kompletom MasterPure® Yeast DNA Purification Kit, ki je namenjen izolaciji DNK iz kvasnih celic za nadaljnjo uporabo v številnih aplikacijah, vključno s pomnoževanjem s PCR (EpiBiot, 2010). Omenjena metoda je bila izmed vseh metod najbolj enostavna, zanjo smo potrebovali najmanj časa in različnih reagentov. Poleg tega se je izkazala tudi kot zelo uspešna. Na podlagi slik agarozne gelske elektroforeze smo ocenili, da je poleg dveh drugih metod zagotovila največjo količino izolirane DNK (slika 6). Tudi v nadaljnjih stopnjah poskusa so se naše ocene izkazale kot utemeljene. S to metodo smo namreč hitro, enostavno in uspešno neposredno izolirali DNK iz različnih virov. Na podlagi rezultatov izolacije na sliki 6 lahko tudi vidimo, da je izolacija DNK *Aspergillus oryzae* v vseh primerih neuspešna, iz česar lahko sklepamo, da uporabljene metode izolacije niso primerne za izolacijo DNK iz filamentoznih gliv.

### 5.1.2 Namnožitev kulture in določanje koncentracije mikroorganizmov

S klasičnimi metodami določanja števila kvasovk smo določili koncentracijo kvasovk v tekočem gojišču YPD po 48 urah inkubacije pri 28 °C in pri 220 obr/min. Z neposrednim določanjem števila celic s štetjem pod mikroskopom in nacepljanjem redčitev na trdno gojišče WL, smo želeli določiti koncentracijo kvasovk z namenom, da bi lahko izolirali DNK iz točno določenega števila kvasovk, ki bi nam predstavljal standard za izdelavo umeritvene krivulje. Koncentracija celic določena z neposrednim štetjem pod mikroskopom v števeni komori po Bürker-Türku (preglednica 6) se pri sevih *S. cerevisiae* skoraj popolnoma ujema z izračunanim številom CFU/mL (preglednica 7), med tem ko prihaja pri sevu *D. bruxellensis* do odstopanja. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da vrsta *S. cerevisiae* v primerjavi z vrsto *D. bruxellensis*, uspešneje raste na uporabljenem gojišču, in da je število CFU/mL, ko gre za vrsto *D. bruxellensis*, relativno nezanesljiv podatek o dejanski koncentraciji kvasovk. Gojišče WL agar je diferencialno gojišče, ki se

uporablja za razlikovanje med kvasovkami iz rodu *Saccharomyces* in kvasovkami, ki niso iz tega rodu (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Naši rezultati to potrjujejo. Iz slik 5, 6, in 7 je namreč razvidno, da je dejansko možno vrsto kvasovk razlikovati že na podlagi barve kolonije. Kolonije kvasovk *S. cerevisiae* (slika 7, slika 9) so bele barve, med tem ko so kvasovke vrste *D. bruxellensis* obarvane zeleno (slika 8). Kot merodajne za nadaljnje izračune smo vzeli v obeh primerih koncentracijo, ki smo jo določili s štetjem pod mikroskopom.

Ptevilo CFU določeno z gojenjem na trdnem gojišču se lahko razlikuje od števila določenega z neposrednim štetjem iz različnih razlogov. Prvi razlog neujemanja je, da pri neposrednem štetju preštejmo tudi mrtve celice, ki na trdnem gojišču ne morajo tvoriti kolonij. Drugi razlog neujemanja, ki je bolj izrazit pri določanju števila *D. bruxellensis*, je najverjetneje ustreznost gojišča za rast kvasovk. Pri namnožitvi v tekočem gojišču smo namreč uporabili YPD gojišče, ki je splošno gojišče in podpira rast različnih vrst kvasovk, med tem ko je WL diferencialno gojišče za razlikovanje rodu *Saccharomyces* od drugih rodov (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da *D. bruxellensis* ne rase tako uspešno na gojišču WL kot *S. cerevisiae*, poleg tega je potrebna daljša inkubacija, da kolonije dosežejo ustrezno velikost.

### 5.1.3 Klasični PCR in izbira oligonukleotidnih začetnikov

Na podlagi rezultatov klasičnega PCR smo izmed štirih parov oligonukleotidnih začetnikov izbrali oligonukleotidne začetnike ScerF/ScerR (Hierro in sod., 2007) specifične za *S. cerevisiae* in oligonukleotidne začetnike Brett1/Brett2 (Tessonnière in sod., 2009) specifične za *D. bruxellensis*. Pojav signala na mestu pozitivne kontrole pomeni, da je oligonukleotidni začetnik učinkovit in specifičen (slika 10).

### 5.1.4 Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov

Namen optimizacije koncentracije oligonukleotidnih začetnikov je bil določiti optimalno koncentracijo nukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR (Hierro in sod., 2007) ter Brett1/Brett2 (Tessonnière in sod., 2009), kar hkrati zagotavlja relativno visoko občutljivost metode in nizko koncentracijo nespecifičnih produktov in oligonukleotidnih dimerov. Visoko občutljivost metode določimo na podlagi  $C_q$  vrednosti, ki morajo biti pri dani koncentraciji začetnikov čim nižje, hkrati pa na podlagi oblike disociacijske krivulje določimo specifičnost nastalih pomnožkov in morebiten nastanek dimerov. Vrednost  $C_q$  nam pove število ciklov pomnoževanja, ki so potrebni, da v danih razmerah aparatura zazna signal. Oblika disociacijske krivulje, nam pove ali je prišlo pri reakciji do tvorbe nespecifičnih produktov ali ne. Pravilna krivulja z enim samim, relativno visokim vrhom nakazuje, da je nastali produkt specifičen. V primeru, ko je disociacijska krivulja nepravilne oblike in ima več vrhov, ki so relativno nizki, lahko sklepamo, da je med reakcijo prišlo do tvorbe dimerov oziroma do nastanka nespecifičnih produktov (Applied Biosystems, 2006). Pojav signala pri negativni kontroli opisujejo tudi nekateri avtorji, ki ga prav tako razlagajo z nastankom dimerov oligonukleotidnih začetnikov, ki se akumulirajo tekom reakcije, na katere se nato veže barvilo in povzroči nastanek signala (Hierro in sod., 2006). Primer pojava signala lahko vidimo na sliki 11, kjer je  $C_q$  vrednost vzorca relativno nizka ( $C_q \sim 20$ ), skrajno desno na grafu pa lahko vidimo, da se pri danih pogojih signal pojavi tudi pri

negativni kontroli in v reakciji, kjer je bila namesto DNK dodana samo H<sub>2</sub>O. Ker to ni v skladu s pričakovanji, smo preverili izvor signala na podlagi oblike disociacijske krivulje. Disociacijske krivulje omenjenih reakcij so prikazane na sliki 12, kjer lahko vidimo, da je disociacijska krivulja vzorca pravilne oblike in relativno visoka, med tem ko je disociacijska krivulja negativne kontrole nepravilne oblike, ima dva vrhova in je relativno nizka. Nizek vrh lahko opazimo tudi pri disociacijski krivulji reakcije s H<sub>2</sub>O. Na podlagi tega lahko zaključimo, da je izvor signala, ki se pojavi pri negativni kontroli in reakciji s H<sub>2</sub>O na sliki 11, posledica nastanka nespecifičnih produktov oziroma dimerov (Applied Biosystems, 2006).

Iz rezultatov v preglednici 8 je razvidno, da je optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov Brett1/2 za izdelavo umeritvene krivulje 50nM/50nM (preglednica 8). Pri tej koncentraciji je vrednost C<sub>q</sub> sorazmerno nizka (~20), medtem ko se signal pri negativni kontroli in NTC pojavi zelo pozno, to je v 38. oz. 39 ciklu. Tudi nastalih nespecifičnih produktov je relativno malo. Pri kombinacijah z višjimi koncentracijami oligonukleotidnih začetnikov je sicer C<sub>q</sub> vrednost vzorca nižja, vendar pri tem nastane več nespecifičnega produkta, kar se kaže tudi kot nižje C<sub>q</sub> vrednosti negativne kontrole in NTC. Do podobne ugotovitve smo prišli tudi pri optimizaciji oligonukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR (preglednica 9). Pri koncentraciji 50nM/50nM lahko pri pozitivni kontroli vidimo relativno nizko vrednost C<sub>q</sub> (~17). V nasprotju z začetniki Brett1/Brett2 se signal pri negativnih kontrolah tu pojavi relativno zgodaj, v 31. oziroma 32. ciklu.

Rezultati so v skladu s pričakovanji, saj znaša priporočena koncentracija oligonukleotidnih začetnikov za kvantifikacijo z barvilom SYBR Green prav toliko (Applied Biosystems, 2006). Barvilo SYBR Green se namreč veže nespecifično na dvovijačno DNK, kar pomeni, da se veže tudi na nastale oligonukleotidne dimere. Pri višjih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov nastane več dimerov, kar povzroči pojav signala pri negativni kontroli, kar je razvidno iz preglednic 8 in 9. Izvor signala lahko ločimo na podlagi analize disociacijske krivulje, saj se talilna temperatura oligonukleotidnih dimerov razlikuje od talilne temperature specifičnega pomnožka. Poleg tega se signal, ki je posledica nastanka oligonukleotidnih dimerov pojavi v poznejših ciklih, kot signal specifičnega produkta. Pri izdelavi umeritvene krivulje za določanje števila *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* smo želeli znižati nastanek nespecifičnih produktov in oligonukleotidnih dimerov na najnižjo možno raven, zato smo se na podlagi rezultatov odločili, da bomo za izdelavo obeh umeritvenih krivulj uporabili nižjo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov od priporočene in določene optimalne koncentracije. Za izdelavo umeritvenih krivulj, smo torej uporabili pare oligonukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR (Hierro in sod., 2007) in Brett1/Brett2 (Tessonnière in sod., 2009) v koncentraciji 45nM/45nM. Tudi sicer smo na podlagi analize disociacijske krivulje ugotovili, da je nastanek nespecifičnih produktov in oligonukleotidnih dimerov sorazmeren s koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov. Višja kot je skupna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov, več nespecifičnih produktov in oligonukleotidnih dimerov nastane med reakcijo.

### 5.1.5 Izdelava umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk

V preglednici 10 so prikazane najpomembnejše karakteristike umeritvene krivulje določene na podlagi redčitev DNK izolirane iz seva *S. cerevisiae* ZIM 1927. Vidimo lahko, da karakteristike umeritvene krivulje ne zadoščajo kriterijem učinkovitosti PCR. Vrednost koeficienta  $k$  znaša -4,155, med tem ko je učinkovitost komaj 74,05 %. Učinkovitost PCR je namreč zadovoljiva, kadar je vrednost koeficienta  $k$  v enačbi premice med vrednostma -3,1 in -3,6 ter izračunana učinkovitost  $E$  med 90 % in 110 % (Pfaffl 2001). Nizka je tudi senzitivnost metode, meja detekcije je od  $10^5$  do  $10^7$  CFU/mL. Iz priloge A lahko vidimo, da so vrednosti standardnih deviacij vzporednih vzorcev relativno visoke. To nakazuje na nenatančnost pri izdelavi umeritvene krivulje, kar je najverjetneje poglavitni vzrok slabim karakteristikam umeritvene krivulje. Na podlagi teh rezultatov in izračunov smo se odločili, da zgornjo umeritveno krivuljo ne uporabimo za določanje števila kvasovk v realnih vzorcih v nadaljnjih stopnjah poizkusa.

Tudi karakteristike druge umeritvene krivulje za določanje števila *S. cerevisiae* ne zadoščajo kriterijem učinkovitosti PCR. V našem primeru koeficient  $k$  znaša -5,0503 pri 57,76 % učinkovitosti. Meja detekcije pri drugi umeritveni krivulji je veliko boljša kot pri prvi, in sega od  $10^3$  do  $10^7$  CFU/mL. Na podlagi tega dejstva smo se odločili, da bomo za določanje števila kvasovk v realnih vzorcih v nadaljevanju poizkusa uporabili umeritveno krivuljo, izdelano na podlagi DNK izoliranega iz komercialnega seva *S. cerevisiae* EC-1118. Kljub temu, da gre v obeh primerih za isto vrsto, je prišlo pri izdelavi umeritvene krivulje do opaznejše razlike pri senzitivnosti metod. Poleg tega so standardne deviacije  $C_q$  vrednosti vzporednih redčitev pri drugi umeritveni krivulji manjše. To lahko vidimo tudi na podlagi primerjave slik poteka PCR v realnem času v prilogi A in B. Pri drugi umeritveni krivulji že na podlagi slike poteka PCR v realnem času lahko opazimo večjo homogenost vzporednih rezultatov pri posamezni redčitvi.

Karakteristike umeritvene krivulje narejene na podlagi serijske redčitve DNK izolirane iz *Dekkera bruxellensis* ne zadoščajo kriterijem učinkovitosti PCR, vendar se kljub temu omenjenim kriterijem od vseh izdelanih umeritvenih krivulj najbolj približa. Iz preglednice 12 lahko vidimo, da ima koeficient  $k$  vrednost -3,7754 in da je učinkovitost PCR 84,02 %. Meja detekcije je relativno nizka in sega od  $10^2$  do  $10^7$ , kar pomeni da je občutljivost relativno visoka. Iz rezultatov lahko vidimo, da je bil pri negativni kontroli z DNK *S. cerevisiae*, rezultat pomnoževanja pozitiven. Pojav pozitivnega rezultata pri negativni kontroli je najverjetneje posledica akumulacije dimerov oligonukleotidnih začetnikov, na katere se veže barvilo SYBR Green. Nastanek nespecifičnih produktov in posledično lažno pozitivnih rezultatov lahko naknadno določimo z analizo disociacijske krivulje (Hierro in sod., 2006). Ker se signal pri negativni kontroli v povprečju pojavi v sredini 36 cikla pomnoževanja, smo določili, da je umeritvena krivulja relevantna na območju od  $C_q = 20$  do  $C_q = 36$ . Izdelano umeritveno krivuljo smo v nadaljevanju poskusa uporabili za določanje števila *D. bruxellensis* v vzorcih mošta in vina.

Možnih vzrokov za neustreznost izdelanih umeritvenih krivulj je več. Najverjetnejši razlog slabih karakteristik je nenatančnost pri izdelavi umeritvenih krivulj, predvsem nenatančnost pri pipetiranju. Kot kritično točko lahko izpostavimo pripravo redčitev DNK po Kochu, kjer se zaradi pipetiranja izredno nizkih volumnov (2  $\mu$ L), morebitna napaka hitro potencira. Primerneje bi morda bilo pripraviti redčitveno vrsto kulture kvasovk, iz

katere bi nato izolirali DNK. V tem primeru napake pri pipetiranju ne bi imele tako velikega vpliva na rezultat. Drug možen razlog slabih karakteristik umeritvenih krivulj, predvsem nizke senzitivnosti je koncentracija oligonukleotidnih začetnikov. Pri izdelavi umeritvenih krivulj smo uporabili oligonukleotidne začetnike v koncentraciji 45 nM. Priporočena koncentracija za uporabo s SYBR Green barvilom je 50 nM (Applied Biosystems, 2006). Nižjo koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov od priporočene smo uporabili na podlagi rezultatov optimizacije koncentracije začetnikov, ker smo se želeli izogniti nastanku oligonukleotidnih dimerov. Na podlagi senzitivnosti izdelanih umeritvenih krivulj (preglednica 10, 11, in 12) lahko trdimo, da je koncentracija začetnikov 45 nM za izdelavo umeritvene krivulje za določanje *D. bruxellensis*, primerna, med tem ko je za izdelavo umeritvene krivulje za določanje *S. cerevisiae*, ta koncentracija prenizka. Kljub temu bi bila v obeh primerih 50 nM koncentracija oligonukleotidnih začetnikov ustrežnejša.

V vseh ponovitvah reakcij PCR v realnem času smo, tako v vzorcih kot pri negativnih kontrolah, v zadnjih ciklih pomnoževanja zaznali povečanje signala. Da bi ugotovili izvor povečanja signala, smo preverili več kritičnih točk reakcije. Tako smo z zniževanjem koncentracije oligonukleotidnih začetnikov zmanjšali možnost nastanka dimerov, izključili možnost neustreznih in kontaminiranih oligonukleotidnih začetnikov, ter s ponovitvami preverjali napake pri izvedbi. Vzroka kljub temu nismo uspeli odkriti. V nadaljevanju postavitve metode bi tako veljalo preizkusiti komercialni komplet za izvedbo PCR v realnem času drugega proizvajalca. Uporabljeni komercialni komplet je edina skupna točka vseh reakcij, ki je nismo preverili in je najverjetnejši vzrok pojavu signala v negativni kontroli.

### 5.1.6 Določanje števila kvasovk v realnih vzorcih

Iz rezultatov lahko vidimo, da se število kvasovk določenih z neposrednim štetjem pod mikroskopom v vseh fermentacijah giblje med  $10^7$  in  $10^8$  (slika 16, slika 17, slika 18 in slika 19). Rezultati so v skladu s pričakovanji, saj je običajna koncentracija kvasovk, ki jo dosežejo kvasovke tekom vinske fermentacije od  $10^7$  -  $10^8$  celic/mL (Fleet, 2003). Glede na to da so bili naši vzorci odvzeti v času od 18. 11. 2008 do 19. 12. 2008, zamrznjeni in nato odmrznjeni in analizirani v začetku maja 2009, lahko sklepamo, da je določen del prešteti celic mrtvih in nesposobnih za rast. Rezultati pridobljeni s štetjem kolonij na trdnem gojišču to potrjujejo. Iz grafičnih prikazov lahko vidimo, da se število CFU/mL ne ujema s številom določenim z neposrednim štetjem pod mikroskopom. Poleg tega pri relativno velikem številu vzorcev plošče niso bile šteвне, saj na njih ni bilo niti ene kolonije. Plošče so šteвне kadar je na posamezni plošči med 25 in 250 kolonij (Fugelsang in Edwards, 2007). To je najverjetneje posledica zamrzovanja in ponovnega odmrzovanja vzorcev. Na podlagi rezultatov določanja števila *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* s PCR v realnem času naj bi bili obe vrsti prisotni v vseh štirih fermentacijah, kljub temu, da je sev ZIM 701 (*D. bruxellensis*) dodan samo v fermentacijah prikazanih na slikah 17 in 18. Posamezni vzorci iz omenjenih fermentacij so izkazovali pozitiven rezultat pri določanju števila *D. bruxellensis*, kljub omejeni umeritveni krivulji in dodatnem preverjanju izvora signala na podlagi disociacijske krivulje. Iz tega lahko sklepamo, da je v ostalih dveh fermentacijah prišlo do kontaminacije s sevom *D. bruxellensis* (slika 16 in 19).

Iz slik 16, 17, 18 in 19 lahko tudi vidimo, da naj bi bila koncentracija *S. cerevisiae* v vseh vzorcih med  $10^5$  in  $10^6$  celic/mL in koncentracija *D. bruxellensis* od  $10^3$  do  $10^5$  celic/mL. Ker z neposrednim določanjem števila pod mikroskopom določimo celokupno število kvasovk, točnost rezultatov pridobljenih s PCR v realnem času ne moremo neposredno primerjati (Fugelsang in Edwards, 2007). Kot smo ugotovili karakteristike umeritvenih krivulj ne zadostujejo kriterijem, na podlagi tega lahko torej sklepamo, da rezultati določanja števila *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* niso točni. Na to nakazuje tudi dejstvo, da je seštevek koncentracije obeh vrst kvasovk večji od celokupnega števila določenega s štetjem pod mikroskopom.

Iz rezultatov (slika 20) lahko vidimo, da je *Saccharomyces cerevisiae* prisotna v vzorcu 3 in 4. V vzorcu 3 naj bi bilo po naših izračunih približno  $10^5$  celic/100 mL in v vzorcu 4 med  $10^3$  in  $10^4$  celic/100 mL. Na podlagi rezultata pozitivne kontrole (*S. cerevisiae*, slika 20) lahko sklepamo, da je dejanska koncentracija *S. cerevisiae* v vzorcih višja. Rezultat določanja koncentracije *S. cerevisiae* pri pozitivni kontroli s PCR v realnem času je namreč  $\sim 10^3$  celic/mL, med tem ko je dejanska koncentracija pozitivne kontrole  $10^7$  celic/mL. Prav tako naj bi bila v vzorcih 3 in 4 prisotna *Dekkera bruxellensis*, in sicer v koncentraciji  $10^6$  celic/100 mL v vzorcu 3, ter nekoliko več kot  $10^4$  celic/100 mL v vzorcu 4. Če sklepamo na podlagi pozitivne kontrole, kjer se rezultat določanja števila *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae* s PCR v realnem času ne ujema z dejanskim številom teh kvasovk v vzorcih, lahko vidimo, da metoda v tej stopnji ni postavljena tako, da bi bila točna. Zaradi slabih karakteristik umeritvenih krivulj smo to tudi pričakovali. V vzorcih 1 in 2 na podlagi naših rezultatov *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* nista prisotni, med tem ko je v vzorcu 5 prišlo do inhibicije PCR in tega z gotovostjo ne moremo trditi. Iz slike 20 lahko vidimo tudi, da so odstopanja med posameznimi metodami določanja števila mikroorganizmov v realnih vzorcih veliko večja, kot pri določanju števila v čisti kulturi. Dodatne analize vzorcev pokvarjenih vin in identifikacija izoliranih kolonij so pokazale, da sta vrsti *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* dejansko prisotni v vzorcu 3 in 4, med tem ko jih v vzorcih 1, 2 in 5 ni. Rezultati teh analiz so v skladu z rezultati, ki smo jih pridobili s PCR v realnem času.

Različne metode določanja števila kvasovk delujejo po različnih principih, zato neposredno primerjanje pridobljenih rezultatov ni enostavno, saj pri rezultatih lahko prihaja do večjih ali manjših neujemanj. Neujemanja med rezultati pridobljenimi z metodami, ki vključujejo gojenje in molekularnimi metodami najpogosteje razlagamo kot posledica neustreznega medija, nizkega deleža določene vrste v celotni mikrobnii populaciji ali prisotnosti v VBNC stanju (Millet in Lonvaud-Funel, 2000). Tudi pri naših rezultatih je prišlo do neujemanj, ki so poleg omenjenih razlogov, najverjetneje posledica napak pri izdelavi umeritvenih krivulj. Iz rezultatov na sliki 20 je razvidno, da se neskladnosti v večji meri pojavljajo pri realnih vzorcih kot pri kontroli. Nadaljnja analiza vzorcev pokvarjenih vin in identifikacija izoliranih kolonij je potrdila prisotnost *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* v vzorcih 3 in 4, ter odsotnost omenjenih vrst v preostalih treh vzorcih. Glede na to, da je identifikacija potrdila rezultate, ki smo jih pridobili s PCR v realnem času, lahko zaključimo, da smo metodo postavili do stopnje, kjer lahko prisotnost *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* določamo kvalitativno. Da bi lahko kvasovke določali tudi kvantitativno, bi bilo potrebno ponovno izdelati umeritveni krivulji.

Odstopanja med rezultati določanja števila kvasovk v vzorcih s štetjem pod mikroskopom in gojenjem na trdnem gojišču so lahko posledica živih celic, ki jih z običajnimi tehnikami

ne moremo namnoževati – VBNC »viable but non-culturable« (Phister in Mills, 2003; Oelofse in sod., 2008). Predvsem pri določanju števila *D. bruxellensis* z namnoževanjem največkrat predstavlja problem tudi majhen delež vrste v celotni mikrobni populaciji in neprimeren medij (Rodrigues in sod., 2001). Ker imajo različne metode določanja števila kvasovk različne principe, so razlike in odstopanja med tako pridobljenimi rezultati pričakovane. O tem pojavu poročata tudi Millet in Lonvaud-Funelo (2000), ki sta primerjala epifluorescentno mikroskopijo in gojenje na trdnem gojišču.

Obstajata dve glavni prednosti neposrednega določanja mikroorganizmov s PCR v realnem času v primerjavi z metodami, ki vključujejo bogatitev in gojenje na trdnem gojišču. Prva prednost je posledica dejstva, da se številne mikrobne populacije ne odzovejo na obogatitev zaradi poškodb, pomanjkanja ustreznih hranil ali zaradi VBNC stanja. Druga najpomembnejša prednost PCR v realnem času je, da je to izjemno hitra metoda, ki omogoča analizo velikega števila vzorcev v kratkem času. S to metodo lahko določimo okužbo še preden dejansko pride do kvara (Phister in Mills, 2003). Pri določanju števila *D. bruxellensis* z namnoževanjem na trdnem gojišču največkrat predstavlja problem majhen delež vrste v celotni mikrobni populaciji in neprimeren medij (Rodrigues in sod., 2001). PCR v realnem času omogoča določanje števila kvasovk, tudi ko so v vzorcu prisotne v nizki koncentraciji in predstavljajo majhen delež celotne mikrobne populacije (Hierro in sod., 2007). Problem pri določanju števila kvasovk na podlagi DNK izolirane iz vina je, da s to metodo preštejemo tudi mrtve celice. Temu se lahko izognemo z uporabo RT-PCR, to je PCR z reverzno transkripcijo, kjer za izvedbo PCR namesto DNK uporabimo RNK (Hierro in sod., 2006).

## 5.2 SKLEPI

- Za izolacijo DNK kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* iz vzorcev vina in mošta je najprimernejša metoda z uporabo komercialnega kompleta MasterPure<sup>®</sup> Yeast DNA Purification Kit. Metoda je hitra, enostavna in uspešna.
- Gojišče WL omogoča razlikovanje kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* od *Dekkera bruxellensis* na podlagi barve kolonij.
- Pri kvantitativnem PCR v realnem času z uporabo barvila SYBR Green, je optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov 50 nM/50nM.
- Izdelane umeritvene krivulje ne ustrezajo kriterijem učinkovitosti, zato rezultati kvantifikacije kvasovk v realnih vzorcih niso točni.
- Za postavitve metode za določanje števila kvasovk v realnih vzorcih bi bilo potrebno ponovno izdelati umeritveni krivulji za obe proučevani vrsti kvasovk.

## 6 POVZETEK

V vinarstvu so potrebne hitre in občutljive metode za detekcijo in določanje števila kvasovk. Le tako lahko vinarji sprejemajo odločitve v zvezi s procesiranjem vina, in s tem kontrolirajo in preprečujejo kvar (Hierro in sod., 2007). Najpogosteje se za določanje števila kvasovk v vinarstvu uporablja tradicionalne metode, ki vključujejo gojenje na trdnem gojišču. Problem gojitvenih metod je, da so v veliki meri odvisne od fiziološkega stanja mikroorganizmov in sposobnosti rasti (Divol in Lonvaud-Funel, 2005; Millet in Lonvaud-Funel, 2000). Poleg tega tradicionalne metode zahtevajo veliko časa, kar je v primeru sprejemanja odločitev o procesiranju vina med potekom fermentacije povsem neprimerno (Andorrà in sod., 2010). Prednost sodobnih metod določanja števila kvasovk v realnih vzorcih je predvsem v hitrosti, občutljivosti in specifičnosti. Poleg tega sodobne metode omogočajo analizo velikega števila vzorcev v relativno kratkem času (Hierro in sod., 2007). V tej eksperimentalni nalogi smo poskušali postaviti hitro in učinkovito metodo za določanje števila kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* v realnih vzorcih. Postavitev metode je vključevala več stopenj: izbiro najprimernejše metode izolacije DNK kvasovk, izbiro primernih oligonukleotidnih začetnikov, optimizacijo koncentracije oligonukleotidnih začetnikov, izdelavo umeritvene krivulje ter preizkus metode na realnih vzorcih. Ugotovili smo, da je najprimernejša metoda za izolacijo kvasne DNK iz vzorcev vina in mošta metoda z uporabo komercialnega kompleta MasterPure® Yeast DNA Purification Kit. Metoda se je izkazala kot hitra, enostavna in uspešna. Pri optimizaciji koncentracije oligonukleotidnih začetnikov so naši rezultati potrdili priporočilo proizvajalca kompleta za izvedbo PCR v realnem času, ki v primeru detekcije pomnožkov z barvilom SYBR Green priporoča 50 nM koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov. Izdelava umeritvenih krivulj ni bila povsem uspešna, saj so bile karakteristike izdelanih umeritvenih krivulj relativno slabe. Posledično je bilo nemogoče ovrednotiti rezultate določanja števila kvasovk v vzorcih mošta in pokvarjenega vina. Pri nadaljnjem preverjanju rezultatov smo prišli do zaključka, da nam je uspelo metodo za določanje števila kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* v realnih vzorcih postaviti do te mere, da lahko v realnih vzorcih omenjeni vrsti določamo kvalitativno. Da bi z metodo lahko uspešno in točno določali število kvasovk, bi bilo potrebno ponovno izdelati umeritveni krivulji, pri čemer bi veljalo preizkusiti komercialni komplet za PCR v realnem času drugega proizvajalca. Priporočljivo bi bilo tudi spremeniti pripravo redčitvene vrste standardne koncentracije kvasovk. Pripravo redčitvene vrste iz izolirane DNK, bi lahko nadomestili s pripravo redčitvene vrste kvasovk v kulturi, iz katere bi nato izolirali padajoče koncentracije DNK za standard.

## 7 VIRI

- Amerine M. A., Kunkee R. E. 1968. Microbiology of winemaking. Annual Review of Microbiology, 22: 323-358
- Andorrà I., Esteve-Zarzoso B., Guillamón J. M., Mas A. 2010. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. International Journal of Food Microbiology, 144, 2: 257-262
- Applied Biosystems. 2006. Fast Real-Time PCR System and 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems: Chemistry guide. Real-Time PCR Systems. Foster city, Applied Biosystems, 138 str.  
[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_042681.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042681.pdf) (julij 2011)
- Blackwell M., Vilgalys R., James T. Y., Taylor J. W. 2009. Fungi. Maddison D. R., Schulz K.-S. (eds.). Tuscon, Tree of life web project: 19 str.  
<http://tolweb.org/> (oktober 2011)
- Boom R., Sol C. J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P. M., van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology, 28, 3: 495-503
- Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman and Hall: 102-113
- Brand GmbH+Co.KG. 2010. Counting chamber Bürker-Türk. Wertheim, Brand GmbH+Co.KG: 1 str.  
[http://catalog.brand.de/index.php?encrypt=0&ID\\_O\\_TREE\\_GROUP=88&chapter=88&ID\\_O\\_PRODUCT=588&begin=1&Language=English&start\\_infoblock=1](http://catalog.brand.de/index.php?encrypt=0&ID_O_TREE_GROUP=88&chapter=88&ID_O_PRODUCT=588&begin=1&Language=English&start_infoblock=1) (september 2010)
- Delaherche A., Claisse O., Lonvaud-Funel A. 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. Journal of Applied Microbiology, 97, 5: 910-915
- Divol B., Lonvaud-Funel A. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. Journal of Applied Microbiology, 99, 5: 85-93
- Divol B., Miot-Sertier C., Lonvaud-Funel A. 2005. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'refermentation' in botrytis-affected wines. Journal of Applied Microbiology, 100, 3: 516-526
- Dorak M.T. 2006. Real-Time PCR. New York, Taylor & Francis Group: 68-73
- Dulbecco R., Vogt M. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. Journal of Experimental Medicine, 99, 2: 167-182

- EpiBio. 2010. MasterPure<sup>®</sup> yeast DNA purification kit. Madison, Epicentre Biotechnologies: 4 str.  
<http://www.epibio.com/pdftechlit/117pl0611.pdf> (oktober 2010)
- Fairchild M. S., Lee M. D., Maurer J. J., 2006. PCR basics. V: PCR methods in foods. Maurer J. (ed.). Berlin, Springer: 1-25
- Fernández-Espinar T. M., Llopis S., Querol A., Barrio E. 2011. Molecular identification and characterization of wine yeasts. V: Molecular wine microbiology. Carrascosa Santiago A.V., Muñoz R., Garcia R. G. (eds.). London, Elsevier: 111-141
- Fleet G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86: 11 – 22
- Fugelsang K. C., Edwards C. G. 2007. Wine microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Chapman and Hall: 68-114
- Guiver M., Levi K., Oppenheim B.A. 2001. Rapid identification of candida species by TaqMan PCR. Journal of Clinical Pathology, 54, 5: 362-366
- Heard G. M., Fleet G. H. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Applied and Environmental Microbiology, 50, 3: 727-728
- Heid C.A. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research, 6 : 986-994
- Hierro N., Esteve-Zarzoso B., Mas A., Guillamón J.M. 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. Applied and Environmental Microbiology, 72, 11: 7148-7155
- Hierro N., Esteve-Zarzoso B., Mas A., Guillamón J.M. 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. FEMS Yeast Research, 8, 7: 1340–1349
- Invitrogen. 2007. PureLink<sup>™</sup> genomic DNA mini kit. Carlsbad, Invitrogen: 4 str.  
[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_mini\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_mini_man.pdf) (november 2011)
- Jara C., Mateo E., Guillamón J. M., Torija M. J., Mas A. 2008. Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. International Journal of Food Microbiology, 128, 2: 336–341
- Jimenez J., Fidalgo M., Alguacila M. 2000. *Brettanomyces*. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol.1. Robinson R. K., Batt C. A., Patel P. D. (eds.). New York, Academic Press: 302-308
- Jin J., Lee Y.-K., Wickes B. L. 2004. Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. Journal of Clinical Microbiology, 42, 9: 4293-4296

- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 1-2: 23-50
- Mackay I. M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190-212
- Martorell P., Querol A., Fernández-Espinar M. T. 2005. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11: 6823-6830
- McPherson M. J., Møller S.G. 2006. PCR. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, Taylor & Francis: 1-20
- Millet V., Lonvaud-Funel A. 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 2: 136-141
- Mitrakul C. M., Henick-Kling T., Egli C. M. 1999. Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods. *Food Microbiology*, 16, 1: 3-14
- Möller E. M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acid Research*, 20, 22: 6115-6116
- Morrison, T.B., Weis J. J., Wittwer C. T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24, 6: 954-962
- Mullis K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262, 4: 56-61
- Oelofse A., Pretorius I. S., du Toit M. 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29, 2: 128-144
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, 29, 9: 2002-2007
- Pfaffl M. W. 2004. Determination of real-time PCR efficiency - an overview. Freising-Weihenstephan, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung: 24 str. <http://www.gene-quantification.de/qpcr2004-pfaffl.pdf> ( januar 2011)
- Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 9: 1-10
- Phister T.G., D.A. Mills. 2003. Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera Bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 12: 7430-7434

- Qiagen. 2006. DNeasy® blood & tissue handbook. Venlo, Qiagen: 62 str.  
[www.qiagen.com/HB/DNeasy96Tissue](http://www.qiagen.com/HB/DNeasy96Tissue) (november 2011)
- Raspor P., Smole – Možina S., Čadež N. 2001. Identification of yeasts from grape/must/wine system. V: Food microbiology protocols. Spencer J.F.T., Ragout de Spencer A.L. (eds.). New Jersey, Humana Press Inc: 243-257
- Rebrikov D.V., Trofimov D. Y. 2006. Real-Time PCR: A review of approaches to data analysis. Applied Biochemistry and Microbiology, 42, 5: 520-528
- Roche. 2010. DNA Isolation kit for cells and tissues®. Mannheim, Roche Diagnostic GmbH: 26 str.  
[http://e-labdoc.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11814770001\\_en\\_05.pdf](http://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11814770001_en_05.pdf) (november 2011)
- Rodrigues N., Gonçalves G., Pereira-da-Silva S., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. Journal of Applied Microbiology, 90, 4: 588-599
- Romano P., Capece A., Jespersen L. 2003. Taxonomic and ecological diversity of food and beverages yeasts V: Yeasts in food and beverages. Querol A., Fleet G. H. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 24-34
- Salinas F., Garrido D., Ganga A., Veliz G., Martínez C. 2009. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. Food Microbiology, 26, 3: 328-332
- Tessonnière H., Vidal S., Barnavon L., Alexandre H., Remize F. 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. International Journal of Food Microbiology, 129, 3: 237-243
- Viljoen B. C., Heard G. M. 2000. *Saccharomyces cerevisiae*. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 3. Robinson R. K., Batt C. A., Patel P.D. (eds.). New York, Academic Press: 1918-1925
- Walker G. M. 2000. Microbiology of wine-making. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 3. Robinson R. K., Batt C. A., Patel P.D. (eds.). New York, Academic Press: 2306-2310

## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Petru Rasporju za mentorstvo ter pomoč in usmeritve pri izdelavi diplomskega dela.

Posebna zahvala gre somentorici doc. dr. Neži Čadež za potrpežljivo vodenje laboratorijskega dela, za vso pomoč in številne napotke pri izdelavi, ter za strokoven in temeljit pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za strokoven pregled diplomskega dela.

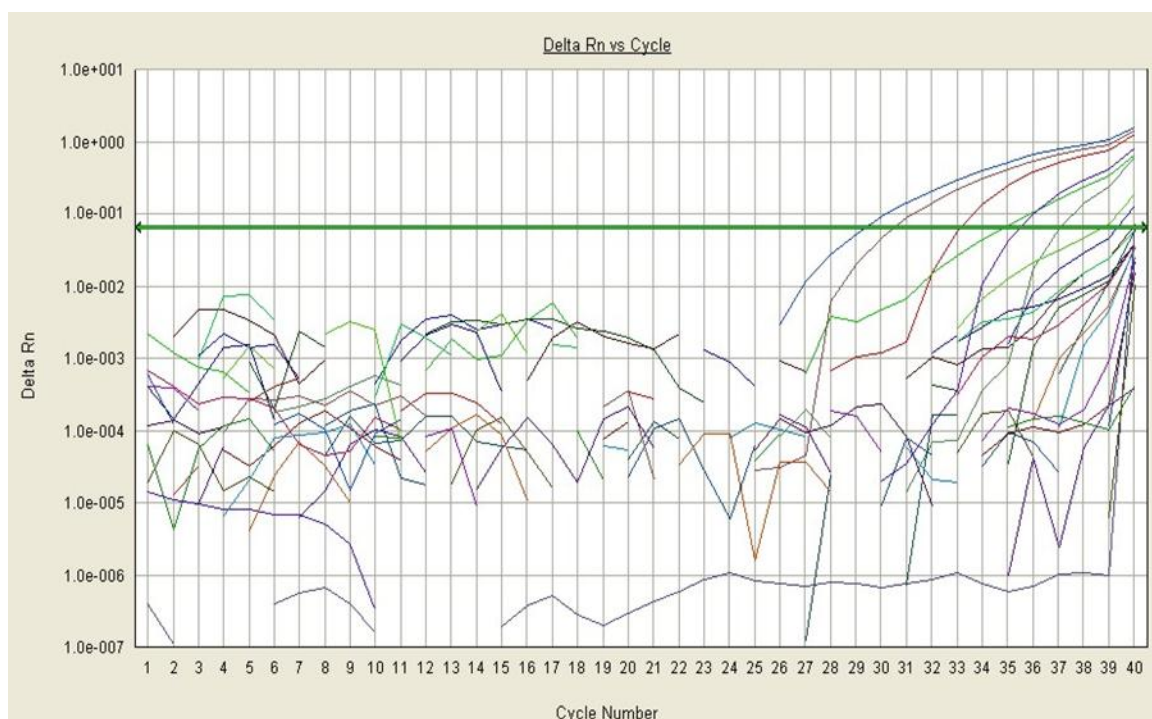
Hvala prijateljem, sošolcem in kolegom, zaradi vas je bilo to obdobje nekaj posebnega.

Še posebej bi se rada zahvalila moji družini in Goranu za vso podporo, spodbudo in pomoč pri študiju.

## PRILOGE

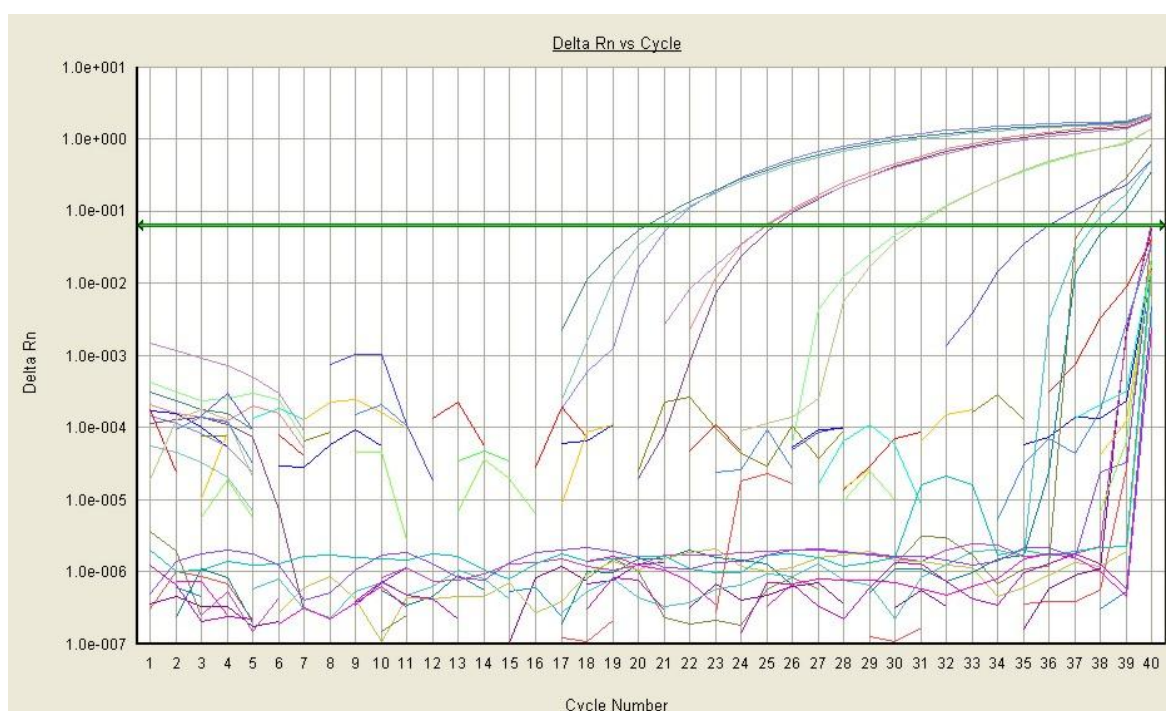
**Priloga A: Rezultati izdelave umeritvene krivulje z začetnimi oligonukleotidi ScerF/ScerR, sev *S. cerevisiae* ZIM 1927**

| CFU/mL                 | C <sub>q</sub> X <sub>1</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>2</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>3</sub> | Povp. C <sub>q</sub> | SD   | ΔC <sub>t</sub> |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------|------|-----------------|
| 10 <sup>7</sup>        | 33,07                         | 30,42                         | 29,30                         | 30,93                | 1,58 |                 |
| 10 <sup>6</sup>        | 34,82                         | 37,01                         | 35,36                         | 35,73                | 0,93 | 4,8             |
| 10 <sup>5</sup>        | 39,20                         | 39,85                         | 38,67                         | 39,24                | 0,48 | 3,51            |
| 10 <sup>4</sup>        | /                             | /                             | /                             | /                    | /    | /               |
| 10 <sup>3</sup>        | /                             | /                             | /                             | /                    | /    | /               |
| 10 <sup>2</sup>        | /                             | /                             | /                             | /                    | /    | /               |
| 10 <sup>1</sup>        | /                             | /                             | /                             | /                    | /    | /               |
| 1                      | /                             | /                             | /                             | /                    | /    | /               |
| Negativna kontrola     | C <sub>q</sub> X <sub>1</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>2</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>3</sub> |                      |      |                 |
| <i>D. bruxellensis</i> | /                             | /                             | /                             |                      |      |                 |
| PCR H <sub>2</sub> O   | /                             | /                             | /                             |                      |      |                 |



**Priloga B: Rezultati Izdelave umeritvene krivulje z začetnimi oligonukleotidi ScerF/ScerR, sev *S. cerevisiae* EC-1118.**

| CFU/mL                 | C <sub>q</sub> X <sub>1</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>2</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>3</sub> | Povp. C <sub>q</sub>          | SD   | ΔC <sub>t</sub> |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|-----------------|
| 10 <sup>7</sup>        | 21,18                         | 20,29                         | 20,85                         | 20,77                         | 0,45 |                 |
| 10 <sup>6</sup>        | 24,95                         | 25,27                         | 24,98                         | 25,07                         | 0,18 | 4,29            |
| 10 <sup>5</sup>        | 30,60                         | 37,22                         | 30,81                         | 30,71                         | 0,15 | 5,64            |
| 10 <sup>4</sup>        | 36,00                         | 38,26                         | 37,63                         | 37,30                         | 1,17 | 6,59            |
| 10 <sup>3</sup>        | /                             | /                             | 39,91                         | 39,91                         | 0,00 | 2,61            |
| 10 <sup>2</sup>        | /                             | /                             | /                             | /                             | /    | /               |
| 10 <sup>1</sup>        | /                             | /                             | /                             | /                             | /    | /               |
| 1                      | /                             | /                             | /                             | /                             | /    | /               |
| Negativna kontrola     |                               | C <sub>q</sub> X <sub>1</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>2</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>3</sub> |      |                 |
| <i>D. bruxellensis</i> |                               | /                             | /                             | /                             |      |                 |
| PCR H <sub>2</sub> O   |                               | /                             | /                             | /                             |      |                 |



**Priloga C: Rezultati izdelave umeritvene krivulje z začetnimi oligonukleotidi Brett 1/Brett 2, sev Dekkera bruxellensis ZIM 701.**

| CFU/mL               | C <sub>q</sub> X <sub>1</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>2</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>3</sub> | Povp. C <sub>q</sub>          | SD   | ΔC <sub>t</sub> |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------|-----------------|
| 10 <sup>7</sup>      | 24,27                         | 21,74                         | 20,71                         | 21,23                         | 0,73 | /               |
| 10 <sup>6</sup>      | 24,61                         | 26,30                         | 24,91                         | 25,27                         | 0,90 | 4,05            |
| 10 <sup>5</sup>      | 28,02                         | 29,73                         | 27,63                         | 28,46                         | 1,12 | 3,19            |
| 10 <sup>4</sup>      | 33,73                         | 32,61                         | 32,39                         | 32,91                         | 0,72 | 4,45            |
| 10 <sup>3</sup>      | 39,05                         | 38,11                         | 36,29                         | 37,82                         | 1,40 | 4,91            |
| 10 <sup>2</sup>      | 39,77                         | 39,61                         | 39,33                         | 39,57                         | 0,22 | 1,75            |
| 10 <sup>1</sup>      | /                             | /                             | /                             | /                             | /    | /               |
| 1                    | /                             | /                             | /                             | /                             | /    | /               |
| Negativna kontrola   |                               | C <sub>q</sub> X <sub>1</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>2</sub> | C <sub>q</sub> X <sub>3</sub> |      |                 |
| <i>S. cerevisiae</i> |                               | 37,66                         | 36,12                         | 36,00                         |      |                 |
| PCR H <sub>2</sub> O |                               | /                             | /                             | /                             |      |                 |



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina LUKAN

**KLASIČNE IN SODOBNE METODE  
DOLOČANJA ŠTEVILA KVASOVK VRST  
*Saccharomyces cerevisiae* IN *Dekkera bruxellensis*  
V REALNIH VZORCIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012