

2. znanstvena konferenca z mednarodno udeležbo

**Konferenca VIVUS – s področja naravovarstva, kmetijstva, hortikulture in živilstva**

»ZNANJE IN IZKUŠNJE ZA NOVE PODJETNIŠKE PRILOŽNOSTI«

24. in 25. april 2013, Biotehniški center Naklo, Strahinj 99, Naklo, Slovenija

2nd Scientific Conference with International Participation

**Conference VIVUS – Environmentalism, Agriculture, Horticulture, Food Production and Processing**

»KNOWLEDGE AND EXPERIENCE FOR NEW ENTREPRENEURIAL OPPORTUNITIES«

24th - 25th April 2013, Biotechnical Centre Naklo, Strahinj 99, Naklo, Slovenia

## **Določanje števila kvasovk vrst *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* v moštu in vinu s kvantitativnim PCR**

**Neža Čadež**

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Slovenija, neza.cadez@bf.uni-lj.si

**Tina Lukan Jezerčić**

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Slovenija, [lukan.tina@gmail.com](mailto:lukan.tina@gmail.com)

**Maja Paš**

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Biotehniški center Naklo,  
Slovenija, [maja.pas@bf.uni-lj.si](mailto:maja.pas@bf.uni-lj.si)

**Peter Raspov**

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Slovenija, [peter.raspor@bf.uni-lj.si](mailto:peter.raspor@bf.uni-lj.si)

### **Izvleček**

Fermentacija grozdnega soka v vino je kompleksen mikrobiološki proces, v katerem imajo kvasovke največji pomen, saj imajo sposobnost pretvorbe sladkorjev grozdja v etanol, ogljikov dioksid in v ostale pomembne metabolite. Za uspešen nadzor nad bioprosesom je nujna določitev števila celic vodilne kvasovke pretvorbe grozdnega soka v vino vrste *Saccharomyces cerevisiae* in hkrati detekcija potencialnih kvarljivcev v končnem proizvodu - vinu. Kot kvarljivki se največkrat pojavljata vrsti *S. cerevisiae*, ki povzroči re-fermentacijo vina, in *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*, ki povzroča bolezen vina, imenovano miševina. Klasične metode določanja števila kvasovk so dolgotrajne in nespecifične. Prispevek opisuje vpeljavo metode kvantitativnega PCR (PCR v realnem času) za določanje števila kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* v moštu in vinu, ki je vključevala izbiro najustreznejše metode izolacije DNK kvasovk neposredno iz mošta/vina, izbor oligonukleotidnih začetnikov ter optimizacijo njihove koncentracije in izračun učinkovitosti kvantitativnega PCR. Metodo smo preizkusili na vzorcih vina z izkazano senzorično napako in na fermentirajočem moštu. Kot najbolj učinkovit postopek izolacije DNK se je izkazala metoda s komercialnim kitom. Za izdelavo umeritvene krivulje za določanje *S. cerevisiae* smo izbrali oligonukleotidna začetnika ScerF/ScerR, za določanje *D. bruxellensis* pa Brett1/Brett2. Rezultati nakazujejo, da je metoda za določanje števila kvasovk s kvantitativnim PCR v primerjavi s klasičnimi metodami hitrejša, bolj učinkovita in bolj specifična.

**Ključne besede:** vinske kvasovke, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, določanje števila kvasovk, kvantitativni PCR, mošt, vino

# **Enumeration of yeasts species *Saccharomyces cerevisiae* and *Dekkera bruxellensis* in must and wine by quantitative PCR**

## **Abstract**

Fermentation of grape juice into wine is complex microbiological processes in which yeasts play a major role by conversion of grape sugars into ethanol, carbon dioxide and other important metabolites. In order to control a bioprocess, a quantity of predominating yeast species of grape juice conversion, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, as well as detection of potential spoilage yeasts in wine, is essential. Among spoilage yeasts the most frequently occurring species is *S. cerevisiae*, which causes re-fermentation of wine and *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*, which causes mousy off-flavors of wine. Traditional methods of enumeration are time-consuming and non-specific. The paper describes introduction of quantitative PCR (qPCR) method for enumeration of *S. cerevisiae* and *D. bruxellensis* in must and wine. Implementation of method included the selection of the most appropriate method for DNA isolation from must/wine, selection of primers and optimisation of their concentration and calculation of qPCR efficiency. The method was tested on samples of wine with off-flavours and fermenting must. Most efficient DNA isolation was achieved with commercial kit. Primers ScerF/ScerR, specific to *S. cerevisiae*, and Brett1/Brett2, specific to *D. bruxellensis* were selected for the establishment of standard curve. The obtained results suggest that qPCR is a faster, more efficient and more specific method than traditional methods of yeasts enumeration.

**Key words:** wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, yeast enumeration, quantitative PCR, must, wine

## **1 Uvod**

### **1.1 Predstavitev problematike**

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, ki povzročata kvar ali med procesom zorenja ali že v ustekleničenem vinu (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 mejo med koristno mikrobnou 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 dejству, da je kontrola prisotnosti kvarljivcev pomembna v vseh stopnjah procesa (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

Za spremeljanje fermentacije vina in detekcijo kvarljivcev potrebuje vinarska industrija hitre postopke določanja števila kvasovk. Za določanje prisotnosti in števila kvasovk je na voljo več različnih metod, vendar so za enologe najpomembnejše tri: štetje pod mikroskopom, membranska filtracija in gojenje na trdnem gojišču. Omenjene metode spadajo med klasične metode določanja števila kvasovk (Fugelsang in Edwards, 2007). Klasične metode so sicer učinkovite, vendar večinoma temeljijo na kultivaciji in so zato 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 kultivacije. Večina teh metod temelji na neposrednem pomnoževanju DNK kvasovk iz vina v verižni reakciji s polimerazo (PCR). Ena izmed takih metod je tudi kvantitativni PCR (ali PCR v realnem času, qPCR), ki se je izkazala kot hitra, neposredna, občutljiva in zanesljiva metoda za določanje števila kvasovk (Hierro in sod., 2007).

## 1.2 Kvantitativni PCR

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, pri kateri encimsko pomnožujemo izbran del tarčnega zaporedja DNK, pri čemer se število kopij tarčnega zaporedja eksponentno povečuje (Fugelsang in Edwards, 2007).

Tehnologija kvantitativnega PCR je nadgradnja standardne reakcije PCR, ki temelji na sposobnosti detekcije in kvantifikacije pomnožkov PCR med potekom pomnoževanja (Fairchild in sod., 2006). Kvantifikacija nastalega produkta poteka ali s fluorescentno označenimi sondami ali z DNK-interkalirajočimi fluorescentnimi barvili v instrumentu za kvantitativni PCR, ki meri fluorescenco med potekom sprememb temperatur v ciklih reakcije PCR (Mackay, 2004). Najenostavnejša in najpogosteje uporabljeni 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). Alternativa nespecifičnim metodam določanja pomnožkov kvantitativnega PCR so specifične metode določanja pomnožkov, na primer z uporabo sonde TaqMan®. Pri TaqMan® kvantitativnem PCR se interna fluorrogena 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).

Rezultat reakcije kvantitativnega PCR je krivulja pomnoževanja, na kateri ločimo bazno linijo, ki predstavlja fluorescentni signal ozadja in jo računalniški program določi med 3. in 15. ciklom pomnoževanja. Največ fluorescence ozadja prispeva pasiven referenčni signal (ROX), ki je dodan vsaki reakciji. Ko fluorescentni signal pomnožkov prestopi prag, ki predstavlja statistično značilno povečanje signala, imenujemo ta cikel pomnožitve prazni oz. kvantitativni cikel (Cp). Absolutna kvantifikacija metode temelji na principu, da če je začetna koncentracija DNK v vzorcu visoka, bomo njene pomnožke zaznali v zgodnejšem ciklu pomnoževanja, kot če je DNK v vzorcu malo. Tako iz poznanih koncentracij določene vrste kvasovk oziroma njene DNK narišemo umeritveno krivuljo, na podlagi katere izračunamo koncentracijo kvasovk v vzorcu. Za zanesljive rezultate potrebujemo reakcijo PCR, ki zagotavlja visoko učinkovitost, saj lahko le take rezultate kvantificiramo. Učinkovitost izračunamo iz naklona umeritvene krivulje in je odvisna od čistosti DNK in pogojev reakcije PCR.

Kljub temu, da so kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* pomembni kvarljivci v proizvodnji vina in da je metoda kvantifikacije mikroorganizmov s kvantitativnim PCR relativno uveljavljena, najdemo le nekaj avtorjev, ki v člankih opisujejo določanje teh dveh vrst kvasovk z omenjeno metodo. Namen raziskave je bil tako postaviti in optimizirati metodo za določanje kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* s kvantitativnim PCR ter na

ta način vpeljati učinkovito, specifično in občutljivo metodo za določanje prisotnosti kvarljivcev v realnih vzorcih mošta in vina.

## 2 Material in metode

### 2.1 Osnovni material

#### 2.1.1 Sevi kvasovk

Seva *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927 in *Dekkera bruxellensis* ZIM 701 smo dobili iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

#### 2.1.2 Mikrobiološka gojišča

Za namnoževanje kvasovk smo uporabili trdno in tekoče gojišče YPD (Merck, Nemčija), za določanje CFU (»colony forming units«) pa trdno gojišče WL (ang. Wallerstein Laboratories Nutrient agar), ki služi za ločevanje med kvasovkami rodu *Saccharomyces* in kvasovkami, ki niso iz tega rodu (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003).

#### 2.1.3 Kvantitativni PCR

Za izolacijo genomske DNK smo uporabili komercialni komplet MasterPure® Yeast DNA Purification Kit (EpiBio, 2010).

Preglednica 1 prikazuje oligonukleotidne začetnike, ki smo jih uporabili v eksperimentu.

Preglednica 1: Uporabljeni oligonukleotidni začetniki

Ime	Zaporedje	Vir
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White in sod., 1990
ITS4	3'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-5'	
Scerevisiae1	5'-ACATATGAAGTATGTTCTATATAACGGGTG-3'	Martorell in sod., 2005
Scerevisiae2	5'-TGGTGCTGGTGCAGGATCTA-3'	
ScerF	5'-ACTGAATTTCGAACGCACATTG-3'	Hierro in sod., 2007
ScerR	5'-CGCAGAGAACCTCTCTTGGAA-3'	
Brett1	5'-GTTCACACAATCCCCTCGATCAAC-3'	Tessonnière in sod., 2009
Brett2	5'-TGCCAAGTGGTGCACCTGGTTACAC-3'	
DBRUXF	5'-GGATGGGTGCACCTGGTTACAC-3'	Phister in Mills, 2003
DBRUXR	5'-TGGTGCTGGTGCAGGATCTA-3'	

#### 2.1.4 Vzorci mošta in vina

Za postavitev metode določanja števila kvasovk v realnih pogojih smo uporabili vzorce fermentirajočega mošta, ki so bili odvzeti ob različnih dnevih fermentacije iz dveh fermentorjev – v prvem je potekala spontana fermentacija, v drugem pa fermentacija, kjer sta bila moštu dodana seva *D. bruxellensis* ZIM 701 in *S. cerevisiae* ZIM 1927. Fermentaciji sta potekali 32 dni. Vzorci so bili zamrznjeni do analiz.

Druga skupina vzorcev predstavlja pet steklenic vin, ki so izkazovala senzorično napako, prejeli pa smo jih na Inštitutu za kmetijstvo Republike Slovenije.

## 2.2 Metode

### 2.2.1 Postavitev metode za določanje števila kvasovk s kvantitativnim PCR

Kulture kvasovk smo inkubirali pri 28 °C 48 ur na trdnem gojišču YPD. Sledila je 48-urna inkubacija v tekočem gojišču YPD na stresalniku pri 220 obr./min in temperaturi 28 °C. Neposredna določitev koncentracije celic v suspenziji (celic/mL) je potekala s štetjem pod mikroskopom z Bürker-Türkovo števno komoro. Za posredno določanje koncentracije celic z

določanjem kolonijskih enot (CFU) smo kulture inkubirali 48 ur pri 28 °C. Iz preštetih kolonij po zaključku inkubacije smo izračunali CFU/mL.

V drugem delu smo izvedli klasični PCR z namenom izbrati najustreznejši 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 oligonukleotidna začetnika, ki sta se izkazala kot najbolj učinkovita in specifična za posamezno vrsto kvasovk - ScerF/R in Brett1/2. Sledila je optimizacija koncentracije izbranih oligonukleotidnih začetnikov, ki zagotavlja relativno visoko občutljivost metode in nizko koncentracijo nespecifičnih produktov in oligonukleotidnih dimerov. Kvantitativni PCR smo izvedli v več ponovitvah, pri čemer je bila edina spremenljivka koncentracija oligonukleotidnih začetnikov. Za posamezni par začetnikov smo pripravili devet različnih reakcijskih mešanic, ki so se razlikovale v koncentraciji posameznega začetnika. Optimalno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov smo uporabili pri izdelavi umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk.

V zadnjem delu postavitve metode smo naredili umeritveno krivuljo za določanje števila kvasovk v realnih vzorcih. DNK smo izolirali iz znanega števila kvasovk ( $N = 1,0 \cdot 10^7$  celic) *S. cerevisiae* ZIM 1927 in *D. bruxellensis* ZIM 701. Umeritveno krivuljo za določanje *S. cerevisiae* smo izdelali z uporabo para oligonukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR v koncentraciji 50 nM, s katerima smo specifično pomnoževali gene za ribosomske RNK, ki zajema regijo ITS2 in gen za 5.8S podenoto rRNA (Hierro in sod., 2007). Izolirano DNK smo redčili po Kochu s korakom po 1 do končne koncentracije, ki ustreza koncentraciji 1 celice. V ploščico za reakcijo PCR smo razdelili 23 µL reakcijske mešanice in dodali 2 µL DNK, in sicer vsako redčitev DNK posameznega seva v treh ponovitvah. Na koncu smo dodali še dve različni negativni kontroli. Prvo negativno kontrolo je predstavljala DNK vrste, za katero uporabljeni oligonukleotidni začetniki niso specifični, druga negativna kontrola pa je brez matrične DNK (NTC). Mikrotitrsko ploščico smo prenesli v aparaturo Real Time PCR 7500 in nastavili ustrezni program kvantitativnega PCR (Hierro in sod., 2007; Tessonnière in sod., 2009). Umeritveno krivuljo za določanje števila kvasovk *D. bruxellensis* smo določili z oligonukleotidnima začetnikoma Brett1/Brett2, ki specifično pomnožujeta 108 baznih parov dolg odsek gena RAD4 (Tessonnière in sod., 2009).

Rezultati kvantitativnega PCR so graf poteka reakcije, vrednosti Cp in denaturacijska krivulja, s katero preverjamo specifičnost pomnoževanja s kvantitativnim PCR. Tako določene vrednosti Cp 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 *S. cerevisiae* v realnih vzorcih. Umeritveni krivulji določimo naklon premice (k), koeficient korelacije ( $R^2$ ), mejo detekcije in učinkovitost (E), ki jo izračunamo po enačbi:

$$E = (10^{-1/k} - 1) \times 100$$

## 2.2.2 Določanje števila kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in *Dekkera bruxellensis* v realnih vzorcih mošta in vina

Izdelani umeritveni krivulji kvantitativnega PCR za določanje števila kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* smo preizkusili na realnih vzorcih mošta. Po tajangu smo v vzorcih določili koncentracijo celic s klasičnima metodama štetja po Bürker-Türku in z določitvijo CFU (točka 2.2.1). Sledila je izolacija DNK s komercialnim kompletom MasterPure® Yeast DNA Purification Kit (Jin in sod., 2004) in določitev števila *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* v vzorcih s kvantitativnim PCR. Rezultat so bile vrednosti Cp, ki smo jih na podlagi enačbe umeritvene krivulje pretvorili v desetiški logaritem koncentracije celic ( $\log_{10}$  celic/mL).

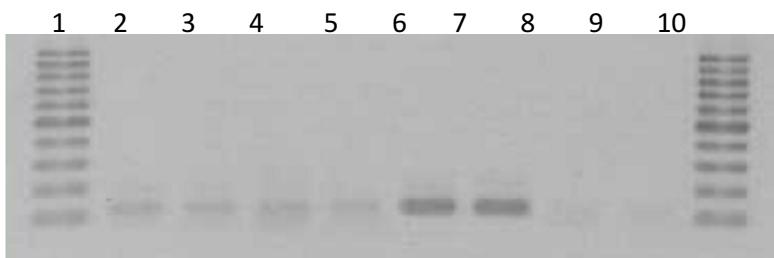
Ker je bila pričakovana koncentracija kvasovk v realnih vzorcih vina relativno nizka, smo skoncentrirali kvasovke iz 100 mL vzorca ter v tako pripravljenem vzorcu določali število

kvasovk na enak način kot v vzorcih mošta. Poleg tega smo določili še CFU z membransko filtracijo, tako da smo 100 mL posameznega vzorca vina sterilno prefiltrirali z membranskim filtrom, ki smo ga nato prenesli na agar WL in inkubirali 48 ur pri temperaturi 28 °C. Izolacijo DNK in kvantitativni PCR smo izvedli po enakem postopku kot pri vzorcih mošta.

### 3 Rezultati

#### 3.1 Izbor oligonukleotidnih začetnikov in optimiziranje njihove koncentracije

Določili smo optimalen par oligonukleotidnih začetnikov specifičen za *S. cerevisiae* (ScerF/R) in par za *D. bruxellensis* (Brett1/2). Kriterij za izbiro je bila uspešnost in specifičnost izvedbe klasičnega PCR, ki smo jo določili na podlagi slike agarozne gelske elektroforeze (Slika 1).



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

Slika 1: 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 kvantitativnem PCR

V preglednicah 2 in 3 so prikazani rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov Brett1/Brett2 oziroma ScerF/ScerR. Izračunane vrednosti Cp predstavljajo povprečje treh ponovitev s pripadajočimi standardnimi odkloni. Negativna kontrola NTC je bila izvedena v eni ponovitvi.

Preglednica 2: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov Brett1 in Brett2

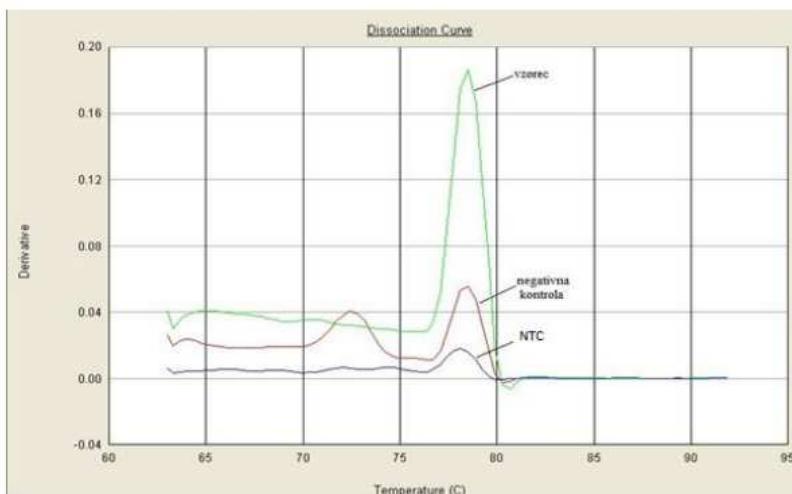
Konc. oligonukleotidnih začetnikov Brett 1/2 (nM/nM)	Cp ± SD <i>D. bruxellensis</i>	Negativna kontrola	
		Cp ± SD <i>S. cerevisiae</i>	NTC
50/50	20,19 ± 0,16	38,18 ± 1,75	39,53
50/300	17,19 ± 0,05	34,38 ± 1,16	-
50/900	18,14 ± 2,59	33,63 ± 1,95	36,43
300/50	18,31 ± 0,67	34,61 ± 1,35	37,89
300/300	16,17 ± 0,07	30,84 ± 0,87	32,75
300/900	15,62 ± 0,34	30,15 ± 1,31	-
900/50	18,36 ± 0,24	33,79 ± 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 3: Rezultati optimizacije oligonukleotidnih začetnikov Scer F in Scer R

Konc. oligonukleotidnih začetnikov Scer F/R (nM/nM)	$C_p \pm SD$ <i>S. cerevisiae</i>	Negativna kontrola	
		$C_p \pm SD$ <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

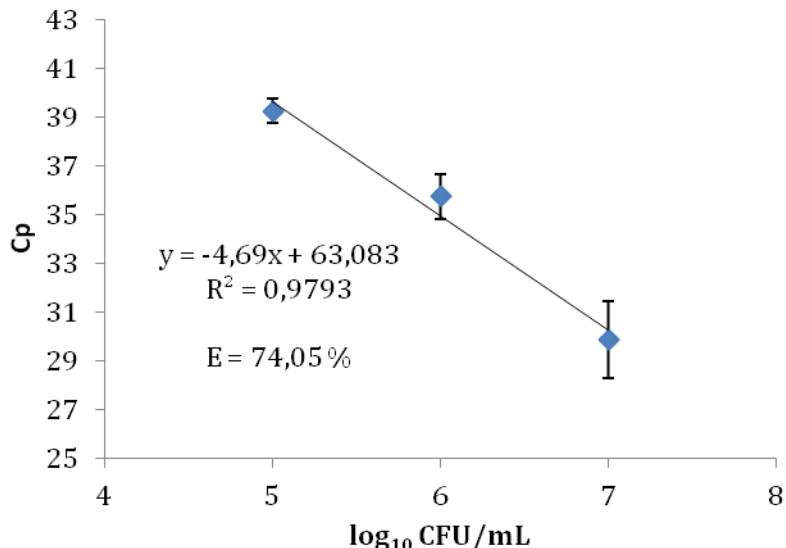
Na podlagi oblike disociacijske krivulje (primer na Sliki 2) smo za posamezno kombinacijo koncentracij oligonukleotidnih začetnikov ocenili količino nastanka oligonukleotidnih dimerov oziroma nespecifičnih produktov. Na podlagi teh rezultatov smo določili optimalno koncentracijo posameznega para oligonukleotidnih začetnikov za izdelavo umeritvene krivulje za določanje števila kvasovk vrst *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*.



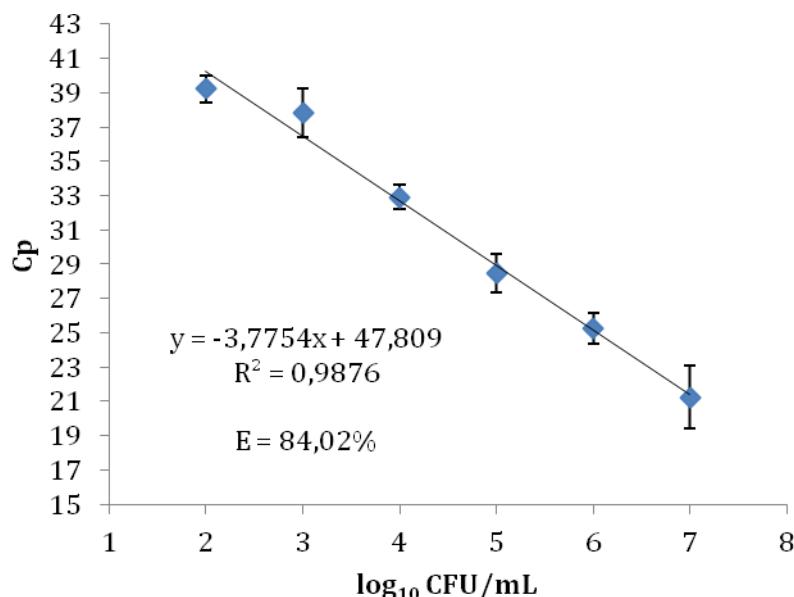
Slika 2: Optimizacija oligonukleotidnih začetnikov Brett1/Brett2,  $c = 50\text{nM}/50\text{nM}$ , primer disociacijske krivulje; os x – temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), os y – odvod (1.) fluorescence signala

### 3.2 Izdelava umeritvenih krivulj za določanje števila kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*

Umeritveno krivuljo za določanje koncentracije celic vrste *S. cerevisiae* v območju od  $10^5$  do  $10^8$  celic/ml smo izdelali z uporabo para oligonukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR v koncentraciji 50 nM (Slika 3). Za določanje koncentracije celic vrste *D. bruxellensis* v območju od  $10^2$  do  $10^7$  celic/ml z oligonukleotidnima začetnikoma Brett1/Brett2 pa v koncentraciji 50 nM (Slika 4).



Slika 3: Umeritvena krivulja pridobljena na podlagi serijske redčitve genomske DNK *S. cerevisiae* ZIM 1927; začetni oligonukleotidi: ScerF/ScerR; vrednosti so povprečje treh ponovitev

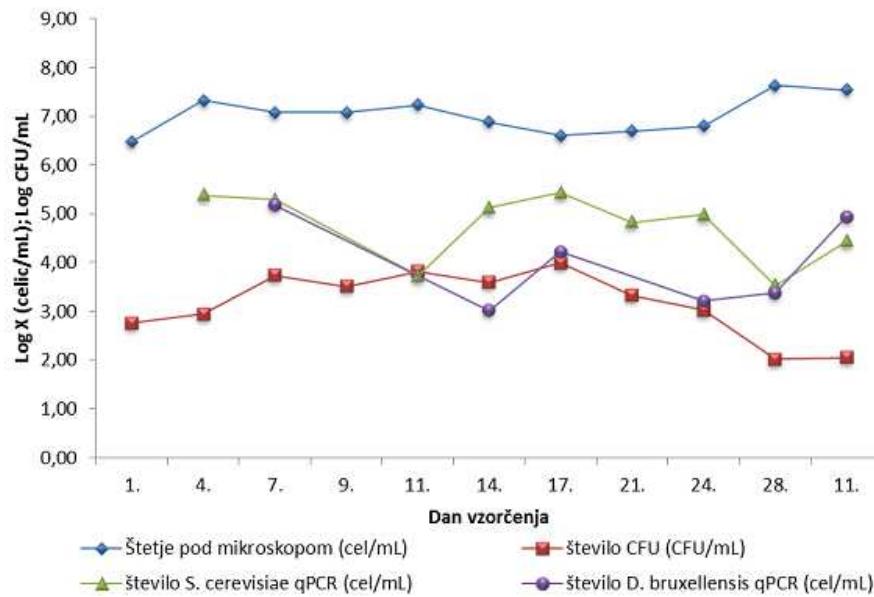


Slika 4: Umeritvena krivulja izdelana na podlagi serijske redčitve genomske DNK *D. bruxellensis* ZIM 701; začetni oligonukleotidi: Brett1/Brett2; vrednosti so povprečje treh ponovitev

### 3.3 Določanje števila kvasovk v vzorcih mošta in vina

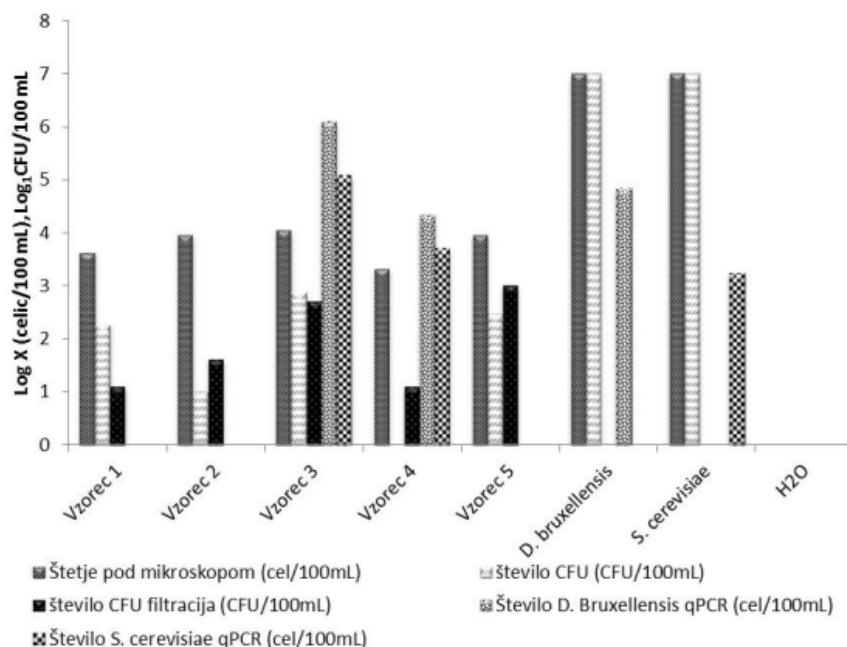
Vzorcem mošta smo določili koncentracijo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* z neposrednim štetjem pod mikroskopom po Bürker-Türku, z določitvijo CFU ter s kvantitativnim. Na različne načine pridobljene rezultate smo poenotili tako, da smo jih pretvorili v  $\log 10$  celic/mL oziroma  $\log 10$  CFU/mL.

Slika 5 prikazuje rezultate določanja števila kvasovk z različnimi metodami med spontano fermentacijo.



Slika 5: Dinamika spremjanja koncentracije kvasovk določena z različnimi metodami med fermentacijo mošta z dodanima sevoma *D. bruxellensis* ZIM 701 in *S. cerevisiae* ZIM 1927

Poleg tega smo petim vzorcem pokvarjenih stekleničnih vin določili koncentracijo kvasovk z različnimi metodami in rezultate prikazali v obliki grafa (Slika 6). 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.



Slika 6: Določanje števila kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* z različnimi metodami v vzorcih vina z izkazano senzorično napako

#### 4 Diskusija in zaključki

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 1).

Optimalna koncentracija nukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR (Hierro in sod., 2007) ter Brett1/Brett2 (Tessonnière in sod., 2009) zagotavlja relativno visoko občutljivost metode in nizko koncentracijo nespecifičnih produktov in oligonukleotidnih dimerov. Visoko občutljivost metode določimo na podlagi Cp 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 Cp 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 ozziroma do nastanka nespecifičnih produktov (Applied Biosystems, 2006). Primer disociacijske krivulje je prikazan na sliki 2. Krivulja je 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. Prikaz na Sliki 1 dopoljujejo rezultati v preglednici 1, iz katere je razvidno, da je optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov Brett1/Brett 2 za izdelavo umeritvene krivulje 50nM/50nM. Pri tej koncentraciji je vrednost Cp 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 Cp vrednost vzorca nižja, vendar pri tem nastane več nespecifičnega produkta, kar se kaže tudi kot nižje Cp vrednosti negativne kontrole in NTC. Do podobne ugotovitve smo prišli tudi pri optimizaciji oligonukleotidnih začetnikov ScerF/ScerR (preglednica 2). Pri koncentraciji 50 nM/50 nM lahko pri pozitivni kontroli vidimo relativno nizko vrednost Cp (~17). V nasprotju z začetniki Brett1/Brett2 se signal pri negativnih kontrolah tu pojavi relativno zgodaj, v 31. ozziroma 32. ciklu.

Na sliki 3 je prikazana umeritvena krivulja in njene najpomembnejše karakteristike določene na podlagi redčitev DNK izolirane iz seva *S. cerevisiae* ZIM 1927. Vidimo lahko, da karakteristike umeritvene krivulje ne zadoščajo kriterijem učinkovitosti PCR. Vrednost koeficiente k znaša -4,155, med tem ko je učinkovitost komaj 74,05 %. Učinkovitost PCR je namreč zadovoljiva, kadar je vrednost koeficiente k v enačbi premice med vrednostima -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<sup>5</sup> od 10<sup>7</sup> CFU/mL. Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da te umeritvene krivulje ne uporabimo za določanje števila kvasov v realnih vzorcih v nadalnjih stopnjah poskusa, ampak smo uporabili umeritveno krivuljo, izdelano na podlagi DNK izoliranega iz komercialnega seva *S. cerevisiae* EC-1118 (rezultati niso prikazani).

Karakteristike umeritvene krivulje narejene na podlagi serijske redčitve DNK izolirane iz *D. bruxellensis* ZIM 701 (slika 4) se omenjenim kriterijem učinkovitosti PCR od vseh izdelanih umeritvenih krivulj najbolj približa. Koeficient k ima vrednost -3,7754, učinkovitost PCR je 84,02 %, območje kvantifikacije pa je relativno nizko in sega od 10<sup>2</sup> do 10<sup>7</sup>, kar pomeni, da je občutljivost relativno visoka. Pojav pozitivnega rezultata pri negativni kontroli (DNK *S. cerevisiae*) 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 je signal pri negativni kontroli v povprečju pojavil v sredini 36. cikla pomnoževanja, smo določili, da je umeritvena krivulja relevantna na območju od Cp = 20 do Cp = 36. Izdelano umeritveno krivuljo smo v nadaljevanju poskusa uporabili za določanje števila *D. bruxellensis* v vzorcih mošta in vina.

Iz rezultatov določanja koncentracije kvasovk v vzorcih mošta (Slika 5) lahko vidimo, da se število kvasovk določenih z neposrednim štetjem pod mikroskopom v vseh fermentacijah giblje med  $10^7$  in  $10^8$ , kar je v skladu s pričakovanji, saj je to običajna koncentracija kvasovk, dosežena tekom vinske fermentacije (Fleet, 2003). Glede na to, da so bili vzorci zamrznjeni in smo jih analizirali čez približno pol leta, lahko sklepamo, da je določen del celic v vzorcih 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. Iz slike 5 je prav tako razvidno, 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 pod mikroskopom določimo celokupno število kvasovk, teh rezultatov ne moremo neposredno primerjati z rezultati, pridobljenimi s kvantitativnim PCR (Fugelsang in Edwards, 2007). Kot smo ugotovili, karakteristike umeritvenih krivulj ne zadostujejo povsem kriterijem, torej lahko 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.

Določanje kvasovk v vzorcih vina z napakami (slika 6) je pokazalo, da je kvasovka *S. cerevisiae* prisotna v vzorcu 3 v koncentraciji okrog  $10^5$  celic/100 mL in v vzorcu 4 med  $10^3$  in  $10^4$  celic/100 mL. Na podlagi rezultata pozitivne kontrole (*S. cerevisiae*, slika 6) lahko sklepamo, da je dejanska koncentracija *S. cerevisiae* v vzorcih višja. Rezultat določanja koncentracije *S. cerevisiae* pri pozitivni kontroli s kvantitativnim PCR je namreč  $\sim 10^3$  celic/mL, medtem ko je dejanska koncentracija pozitivne kontrole  $10^7$  celic/mL. *Dekkera bruxellensis* naj bi bila v vzorcih 3 in 4 prisotna v koncentraciji  $10^6$  celic/100mL 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 kvantitativnim PCR 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 6 lahko vidimo tudi, da so odstopanja med posameznimi metodami določanja števila kvasovk v realnih vzorcih veliko večja kot pri določanju števila kvasovk v čisti kulturi.

Različne metode določanja števila kvasovk delujejo po različnih principih, zato neposredno primerjanje pridobljenih rezultatov ni enostavno. Neujemanja med rezultati pridobljenimi z metodami, ki vključujejo gojenje, in molekularnimi metodami najpogosteje razlagamo kot posledico neustreznega medija, nizkega deleža določene vrste v celotni mikrobnii populaciji ali prisotnosti v stanju VBNC (»viable but non-culturable«) (Phister in Mills, 2003; Oelofse in sod., 2008; Rodrigues in sod., 2001). Tudi pri naših rezultatih je prišlo do neujemanj, ki so poleg omenjenih razlogov, najverjetneje posledica napak pri izdelavi umeritvenih krivulj. Iz rezultatov na sliki 6 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 kvantitativnim PCR, lahko zaključimo, da smo metodo postavili do stopnje, kjer lahko prisotnost *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* določamo kvalitativno. Da bi kvasovke lahko določali tudi kvantitativno, bi bilo potrebno ali izboljšati lastnosti oligonukleotidnih začetnikov (da ne bi tvorili dimerov tekom kvantitativnega PCR), ali pa da bi dodali oligonukleotidno sondu, ki bi zagotovljala večjo specifičnost pomnožitve.

Obstajata dve glavni prednosti neposrednega določanja mikroorganizmov s kvantitativnim PCR v primerjavi z metodami, ki vključujejo bogatitev in gojenje na trdnem gojišču. Prva prednost je posledica dejstva, da se številne mikrofone populacije ne odzovejo na obogatitev zaradi poškodb,

pomanjkanja ustreznih hranil ali zaradi VBNC stanja. Druga pomembna prednost kvantitativnega PCR pa 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 vina (Phister in Mills, 2003). Poleg tega kvantitativni PCR omogoča določanje števila kvasovk, tudi ko so v vzorcu prisotne v nizki koncentraciji in predstavljajo majhen delež celotne mikrobne populacije (Hierro in sod., 2007), kar velja za primer kvasovke kvarljivke vina *D. bruxellensis*. Zaključimo lahko torej, da je kvantitativni PCR hitra, neposredna (brez potrebne kultivacije), občutljiva in zanesljiva metoda za kvantifikacijo kvasovk in s tem lahko preprečimo kvar vina preden nastane nepopravljiva škoda. Naše nadaljnje študije bodo zato usmerjene v optimizacijo te metode in rutinsko uporabo v vinarski mikrobiologiji.

## Literatura

- Applied Biosystems. Fast Real-Time PCR System and 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR Systems: Chemistry guide. Real-Time PCR Systems. Foster city, Applied Biosystems, 2006, 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).
- Boom, R., Sol C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., van der Noordaa, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28, 3, str. 495-503.
- Divol, B., Lonvaud-Funel, A. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99, 5, str. 85-93.
- Dulbecco, R., Vogt, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *Journal of Experimental Medicine*, 1954, 99, 2, str. 167-182.
- EpiBio. MasterPure® yeast DNA purification kit. Madison, Epicentre Biotechnologies, 2010, 4 str.  
<http://www.epibio.com/pdftechlit/117pl0611.pdf> (oktober 2010).
- Fairchild, M. S., Lee, M. D., Maurer, J. J. PCR basics. V: PCR methods in foods. Maurer, J. (ur.). Berlin, Springer, 2006, str. 1-25.
- Fernández-Espinar, T. M., Llopis, S., Querol, A., Barrio, E. Molecular identification and characterization of wine yeasts. V: Molecular wine microbiology. Carrascosa Santiago, A. V., Muñoz, R., Garcia, R. G. (ur.). London, Elsevier, 2011, str. 111-141.
- Fleet, G. H. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 86, str. 11-22.
- Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. Wine microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Chapman and Hall, 2007, str. 68-114.
- Heard G. M., Fleet G. H. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50, 3, str. 727-728.
- Heid, C. A. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 1996, 6, str. 986-994.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Guillamón, J. M. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72, 11, str. 7148-7155.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Guillamón, J. M. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Research*, 2007, 8, 7, str. 1340-1349.
- Jin, J., Lee, Y.-K., Wickes, B. L. Simple chemical extraction method for DNA isolation from *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42, 9, str. 4293-4296.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 86, 1-2, str. 23-50.
- Mackay, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 2004, 10, 3, str. 190-212.

- Martorell, P., Querol, A., Fernández-Espinar, M. T. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71, 11, str. 6823-6830.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30, 2, str. 136-141.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., Wittwer, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 1998, 24, 6, str. 954-962.
- Oelofse, A., Pretorius, I. S., du Toit, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2008, 29, 2, str. 128-144.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, 2001, 29, 9, str. 2002-2007.
- Phister, T. G., Mills, D. A. Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera Bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69, 12, str. 7430-7434.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90, 4, str. 588-599.
- Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., Remize, F. 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*, 2009, 129, 3, str. 237-243.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, N., Gelfand, D., Sninsky J., White. T. (ur.). London: Academic Press, 1990, str. 315-322.