

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet

Dijana Petrić i Matea Vrkljan

Poboljšanje fermentacijskih karakteristika pivskog kvasca za vrenje
sladovine s vrlo visokim udjelom ekstrakta

Zagreb, 2013.

Ovaj rad izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom dr. sc. Mirele Ivančić Šantek, izv. prof. i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012./2013.

Poboljšanje fermentacijskih karakteristika pivskog kvasca za vrenje sladovine s vrlo visokim udjelom ekstrakta

Dijana Petrić (288/BPI) i Matea Vrkljan (6164/BT)

Sažetak: Postupak proizvodnje piva sa sladovinom s visokim udjelom ekstrakta postao je atraktivna alternativa tradicijskom postupku proizvodnje zbog ekonomske isplativosti i kvalitete proizvedenog piva. Međutim većina pivskih kvasaca u sladovini s visokim udjelom ekstrakta raste slabije, fermentacije su spore i zaostaju neprevreli fermentabilni šećeri, a udjel živih stanica u izdvojenom kvascu tijekom fermentacije je vrlo niska. Za uspješnu primjenu tzv. *high gravity brewing* procesa u proizvodnji potrebno je selekcionirati nove sojeve kvasca s poboljšanim fermentacijskim karakteristikama u sladovini s vrlo visokim udjelom ekstrakta. Poboljšan soj kvasca trebao bi biti otporniji na niz čimbenika stresa kojima je izložen tijekom fermentacije, što uključuje osmotski tlak usljed visoke koncentracije šećera, stres izazvan etanolom pri kraju fermentacije, izgladnjivanje stanice, hidrostski tlak i CO₂.

U ovom radu opisana je uspješna strategija za selekciju sojeva kvasca s poboljšanim fermentativnim karakteristikama. Sojevi pivskog kvasca s poboljšanim fermentativnim karakteristikama dobiveni su provođenjem više fermentacija u nizu s mutiranim sojevima u sladovini s vrlo visokim udjelom ekstrakta (25 %).

Izolirano je osam sojeva koji brže fermentiraju sladovinu i postižu veći stupanj prevrenja sladovine. Fermentacijske karakteristike najboljeg soja 12-2 i roditeljskog soja (WT) istražene su provođenjem fermentacija u bioreaktoru. Soj 12-2 ima veću brzinu fermentacije, povećan stupanj konverzije fermentabilnih šećera i povećan prinos etanola u odnosu na divlji soj. Sadržaj trehaloze i glikogena u stanici sojeva 12-2 i WT tijekom fermentacije bio je sličan.

Ključne riječi: fermentacija sladovine s visokim udjelom ekstrakta, lager kvasac, evolucijsko inženjerstvo

Fermentation performance improvement of brewer's yeast under high-gravity condition

Dijana Petrić (288/BPI) i Matea Vrkljan (6164/BT)

Abstract: High gravity brewing has become an attractive alternative to traditional brewing methods due to a number of economic and product quality advantages. However many brewer's strains exhibit decreased growth, slow and incomplete fermentations, and low viability of the cropped yeast during fermentation of high gravity wort. Therefore successful implementation of high gravity brewing in production requires the development of yeast strains with improved fermentation capacity under high gravity condition. Such strain must be resistant to the multiple stress found in the fermentation, including the osmotic stress that results from the high sugar concentration, ethanol stress at the end of fermentation, starvation, hydrostatic pressure and CO₂. Here we describe a successful strategy for selecting yeast strains with improved fermentation performance. The better performing variants of the brewer's yeast were created by subjecting pool of mutagenised variants to consecutive rounds of fermentation in very-high gravity wort (25 % extract). Isolated eight variants showed higher fermentation rate and higher attenuation degree of the wort. Fermentation characteristic of the best performing stain (strain 12-2) and parent strain (WT) were investigated by performing bioreactor fermentations. Strain 12-2 showed higher fermentation rate, increased final fermentable sugar conversion and increased ethanol yield compared to wild type strain. The cellular content of the glycogen and trehalose during fermentation was similar in both strains.

Keywords: high gravity brewing, lager yeast, evolutionary engineering

| | |
|--|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 2. Teorijski dio | |
| 2.1. Tradicijski postupak proizvodnje piva | 2 |
| 2.2. Trošenje šećera u sladovini | 3 |
| 2.3. Fermentacija sladovine s povećanim udjelom ekstrakta | 4 |
| 2.4. Čimbenici stresa tijekom fermentacije sladovine s visokim udjelom ekstrakta | 5 |
| 2.5. Fiziološki odgovor stanice izazvan stresom | 6 |
| 2.5.1. Glicerol | 6 |
| 2.5.2. Trehaloza | 7 |
| 2.6. Glikogen | 9 |
| 2.7. Pivski kvasac | 9 |
| 2.8. Selekcija kvasaca i evolucijsko inženjerstvo | 10 |
| 3. Materijali i metode | |
| 3.1. Materijali | 12 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam | 12 |
| 3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga | 12 |
| 3.1.3. Kemikalije | 12 |
| 3.1.4. Hranjive podloge | 13 |
| 3.1.4.1. Tekuće hranjive podloge | 13 |
| 3.1.4.2. Krute hranjive podloge | 14 |
| 3.2. Aparature | 14 |
| 3.2. Metode i uvjeti uzgoja | 15 |
| 3.2.1. Priprema inokuluma | 15 |
| 3.3. Mutageneza i adaptacija kvasca | 16 |
| 3.3.1. Indukcija mutacija s etil metansulfonatom | 16 |
| 3.3.2. Selekcija soja kvasca s poboljšanim fermentativnim karakteristikama | 16 |
| 3.4. Analitičke metode | 18 |
| 3.4.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase | 18 |
| 3.4.3. Određivanje broja živih stanica u hranjivoj podlozi | 18 |
| 3.4.3. Određivanje udjela živih stanica u hranjivoj podlozi tijekom uzgoja | 18 |
| 3.4.4. Određivanje šećera i metabolita pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) | 19 |
| 3.4.5. Određivanje udjela glikogena i trehaloze u stanici | 20 |
| 4. Rezultati | |
| 4.1. Selekcija sojeva kvasca s poboljšanim fermentativnim karakteristikama | 22 |
| 4.2. Određivanje brzine fermentacije sladovine s izoliranim mutantima kvasca | 24 |
| 4.3. Fermentacija sladovine s visokim udjelom ekstrakta u bioreaktoru | 25 |
| 5. Rasprava | |
| 5.1. Poboljšanje fermentacijskih karakteristikama pivskog kvasca primjenom evolucijskog inženjerstva | 29 |
| 5.2. Kinetika fermentacije sladovine sa sojem 12-2 i WT | 30 |
| 6. Zaključci | 32 |
| 7. Literatura | 33 |

1. UVOD

Tradicijski postupak proizvodnje piva sa sladovinom s 12% ekstrakta danas se sve rjeđe primjenjuje u praksi. Postupno ga zamjenjuje tzv. *high gravity brewing* postupak koji se zasniva na fermentaciji sladovine s visokim udjelom ekstrakta od 14-17 %, a u nekim pivovarama čak i s vrlo visokim udjelom od 18-25 %. Povećanjem udjela ekstrakta povećava se proizvodni kapacitet bez značajnih kapitalnih ulaganja u opremu. Osim što je ekonomski daleko isplativiji od tradicijskog postupka, za prelazak na ovaj postupk proizvodnje nisu potrebna značajnija ulaganja (Lei i sur, 2012).

Pri uvođenju *high gravity brewing* proces u posebnu pažnju treba posvetiti odabiru soja kvasca jer povećana koncentracija šećera u sladovini (osmotski tlak) i visok udjel etanola negativno utječe na fiziologiju stanice, što može promijeniti tijekom vrenja i doviranja, te kvalitetu piva. Sojevi pivskog kvasac koji se primjenjuju u proizvodnji nisu adaptirani na uvjete karakteristične za fermentaciju s vrlo visokim udjelom ekstrakta.

Cilj ovog rada je poboljšati fermentativna svojstva proizvodnog pivskog kvasca na sladovini s vrlo visokom udjelom ekstrakta primjenom tzv. evolucijskog inženjerstva (eng. *evolutionary engineering*). Nakon uvođenja nasumičnih mutacija u genom kvasca, potrebno je odgorarajućim postupkom selekcije izdvojiti sojeve kvasca s poboljšanim fermentacijskim svojstvima, te provesti fermentaciju sladovine s vrlo visokim udjelom ekstrakta sa izoliranim sojevima u bioreaktoru.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Tradicijski postupak proizvodnje piva

Pivo se tradicijski proizvodi fermentacijom sladovine s 11-12 % ekstrakta. Sladovina s 12 % ekstrakta sadrži oko 90 g/L fermentabilnih šećera i 25 g/L nefermentabilnih polisaharida. Najzastupljeniji fermentabilni šećer je maltoza (oko 59 %), a zatim sljede maltotrioza (oko 20 %), glukoza (14%), saharoza (oko 6%) te fruktoza (oko 1%). Od nefermentabilnih šećera u sladovini najveći udio otpada na dekstrine. Fermentacijom sladovine s 12 % ekstrakta dobiva se pivo s 4-5 % (vol/vol) etanola. Glavno vrenje se odvija pri temperaturi od 8-15°C.

Sladovina s 12 % ekstrakta inokulira se s deset miliona stanica po mililitru sladovine, a koncentracija se povećava sa sadržajem ekstrakta (Bamforth, 2003; Munroe, 2006). S obzirom na prisustvo kisika, fermentacija sladovine dijeli se na:

- aerobnu fazu na samom početku vrenja tijekom koje stanice kvasca troše kisik otopljen u sladovini prije inokulacije
- anaerobnu fazu koja nastupa kada stanice potroše sav kisik iz podloge.

Unatoč otopljenom kisiku u aerobnoj fazi fermentacije kvasac anaerobno previre glukozu do etanola i CO₂ usljed represije sinteze enzima respiracijskog lanca visokim koncentracijama glukoze (Crabtree efekt). Kada potrošnjom glukoze u podlozi oslabi njen učinak na metabolizam, izostanak respiracijskog metabolizma kvasca osigurava se anaerobnim vođenjem procesa (Briggs i sur., 2004). U aerobnoj fazi kisik se troši na sintezu komponenti plazmine membrane, sterola i nezasićenih masnih kiselina (Smart, 2008). Tijekom fermentacije sintetizirani lipidi zajedno s manjom količinom preuzetom iz podloge raspodjeljuju se između stanica kćeri. Zbog toga koncentracija nezasićenih masnih kiselina i sterola opada tijekom fermentacije, a u istaloženom kvascu toliko je niska da limitira rast stanica (Briggs i sur., 2004). Rast kvasca ograničen je količinom otopljenog kisika u podlozi neposredno prije inokulacije. Koncentracija otopljenog kiska na uzgoja iznosi oko 8 ppm što je dovoljno za dvije do tri stanične diobe (Munroe, 2006; Smart, 2007).

Nakon što je većina fermentabilnih šećera utrošena kvasac se taloži na dnu fermentora. Istaložen kvasac se nakon izdvajanja ponovno koristi u narednim fermentacijama, najčešće od 10-15 puta (Bamforth, 2003).

Kao izvor dušika kvaščeve stanice prvenstveno koriste slobodne aminokiseline (FAN) zajedno s amonij ionima prisutnim u manjim koncentracijama. Metabolizam aminokiselina, koji uključuje katabolizam asimiliranih aminokiselina iz sladovine i anabolizam potrebnih aminokiselina značajno doprinosi aromi piva. Naime niz intermedijera metabolizma

aminokiselina su prekursori u biosintezi komponenti arome (izo-amil alkohol, izo-butanol, n-propanol).

Osim etanola i ugljičnog dioksida tijekom vrenja nastaje niz produkata metabolizma koji utječu na aromu piva. Oni uključuju više alkohole, estere, aldehide, ketone i sumporne spojeve. Sumporni spojevi su nepoželjni u pivu, a koncentracija sumporovodika i dimetil sulfida ovisi soju kvasca (Bamforth, 2009).

2.2. Trošenje šećera u sladovini

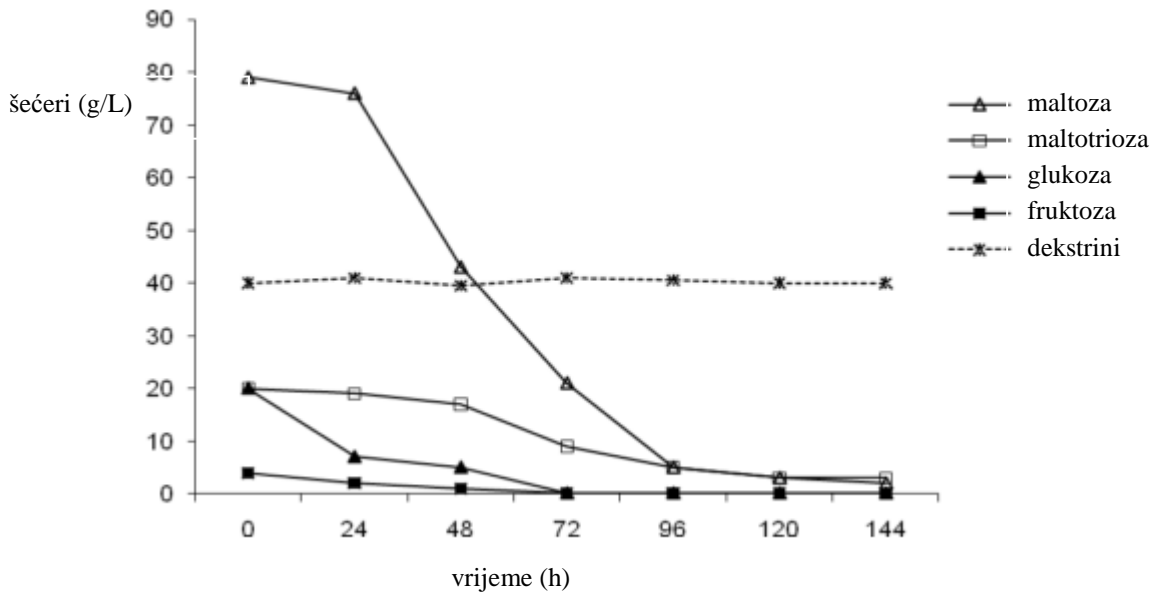
Stanice kvasca troše fermentabilne šećere iz sladovine određenim slijedom (slika 1).

Kvasac najbrže asimilira monosaharide glukozu i fruktozu koje se transportiraju u stanicu olakšanom difuzijom bez utroška energije uz pomoć istog heksoza (Hxt) tansmembranskog prijenosnika. Hxt efikasnije prenosi glukozu od fruktoze što je razlog brže potrošnje glukoze (Meneses i sur., 2002).

Saharozu se ne transportira u stanicu već se hidrolizira s invertazom u periplazmatskom prostoru stanice (Hohmann i Zimmermann, 1986). Enzim invertaza se konstitutivno sintetizira u stanici kada je koncentracija glukoze vrlo niska. Najveća brzina sinteze ovog enzima postiže se kod koncentracije glukoze od 0,1 %. Povećanjem koncentracije glukoze reprimira sintezu invertaze. Hidroliza saharoze na glukozu i fruktozu može uzrokovati porast koncentracije fruktoze (Meneses i sur., 2002).

U prisustvu glukoze u podlozi stanica ne troši maltozu i maltotriozu. Naime glukozu reprimira sintezu enzima maltaze i transportnog sustava za maltozu, te inaktivira transportni sustav za maltozu. Potrošnja maltoze započinje kada je otprilike 60 % glukoze u sladovini utrošeno (D'Amore i sur., 1989). Transport maltoze i maltotrioze odvija se H^+ -simportnim mehanizmom uz utrošak energije (Dietvorst i sur., 2010; Weusthuis i sur., 1993). Maltotriozu nema specifične transportne sustave već se prijenos odvija nekim od maltoznih prijenosnika. Transportni sustav za maltozu efikasnije prenosi maltozu od maltotrioze što je razlog brže asimilacije maltoze (Day i sur., 2002).

Kvasac ne troši dekstrine prisutne u sladovini i oni doprinose okusu punoće piva.



Slika 1. Promjene koncentracije šećera u sladovini tijekom fermentacije (Bamforth, 2009)

2.3. Fermentacija sladovine s povećanim udjelom ekstrakta

Danas se najčešće proizvodi pivo iz sladovine s povećanim udjelom ekstrakta. Dobiveno jako pivo s višim udjelom etanola razrijeđuje se s vodom određenog ionskog sastava na konzumnu koncentraciju etanola. U proizvodnji se koristi sladovina s 14-17 %, a u nekim pivovarama čak i sa 18-25 % ekstrakta. Sladovina s povećanim udjelom ekstrakta priprema se ukomljavanjem slada sa smanjenjem količinom vode i/ili dodatkom neslađenih sirovina (npr. visokofruktoznog sirupa).

Postupak proizvodnje piva sa sladovinom s povećanim udjelom ekstrakta (eng. high-gravity brewing) počeo se primjenjivati tijekom sedamdesetih godina prošlog stoljeća, a već desetak godina kasnije postao je uobičajan način proizvodnje piva (Lei i sur, 2012). Razlog učestale primjene ovog postupka u proizvodnji piva nalazi se ekonomskim pokazateljima. Naime proizvodni kapacitet pivovare povećava se za više od 30 % ovisno o početnom sadržaju ekstrakta i to bez novih investicijskih ulaganja u opremu. Ostale prednosti ovog postupka su: povećan sadržaj etanola po jedinici mase fermentirajućih šećera usljed smanjenog rasta kvasca, povećanje koloidne stabilnosti piva, ujednačenost arome piva, ušteda energije (pumpanje, grijanje, hlađenje, itd.), smanjenje radne snage, ušteda na protoru za vrenje i doviranje, mogućnost proizvodnje više tipova piva razrijeđivanjem iz osnovnog piva (matično pivo) i/ili korištenjem sladnog ekstrakta, ekstrakt hmelja i neslađenih sirovina), ušteda na

sredstvima za čišćenje i dezinfekciju, te smanjena količina otpadnih voda (Stewart i sur., 1997).

Unatoč povoljnoj ekonomskoj računici ovaj proces proizvodnje piva ima i niz nedostataka. Visok sadržaj neprevrelog ekstrakta (posebno maltotrioze) zaostao nakon fermentacije daje pivu nepoželjan okus. Nadalje stabilnost pjene je smanjena najvjerojatnije zbog otpuštanja proteolitičkih enzima izazvanih stresom stanice (povećani osmotski tlak i povećana koncentracija etanola) (Blieck i sur., 2007). Moguća pojava zamućenosti zbog oslobađanja glikogena uslijed lize stanice što se negativno odražava na aromu piva. Kvasac nakon završene fermentacije ima smanjenu životnost (vitalnost), a udjel mrtvih stanica u izdvojenoj bimasi nakon fermentacije povećan je u usporedbi s tradicijskim postupkom proizvodnje piva. Također može doći do promjene arome piva. Koncentracija estera u gotovom pivu ovisi o sadržaju ekstrakta i sastavu šećera u sladovini, te odnosu ukupnog šećera i slobodnog amino dušika (Verstrepen i sur., 2003; Stewart, 2004).

Niska brzina fermentacije sladovine može se povećati korištenjem veće količine inokuluma, primjenom viših temperatura fermentacije i povećavanjem koncentracije otopljenog kisika u sladovini neposredno prije naciepljivanja (Verbelen i sur., 2009; Verstrepen i sur., 2003). Preporučena koncentracija otopljenog kisika iznosi od 12-16 ppm. Pri vođenju fermentacija pri višim temperaturama potrebno je voditi računa da se sadržaj komponenti arome posebice estera mijenja se s temperaturom fermentacije (Saerens i sur., 2008). Povećanjem koncentracije inokuluma može se povećati brzina fermentacije ali samo do određene granice. Međutim povećanje inokuluma može negativno utjecati na aromu piva (Verstrepen i sur., 2003; Verbelen i sur., 2009).

2.4. Čimbenici stresa tijekom fermentacije sladovine s visokim udjelom ekstrakta

Stanice kvasca tijekom fermentacije sladovine s povećanim udjelom ekstrakta izložene su nizu stresnih čimbenika koje nepovoljno utječu na vitalnost stanice, a time i brzinu fermentacije:

1. visok osmotski tlak i niska vodena aktivnost

Na početku fermentacije osmotski tlak je vrlo visok uslijed visoke koncentracije šećera u sladovini; razgradnjom šećera vrijednost osmotskog tlaka opada. Optimalna vodena aktivnost za rast stanica kvasca iznosi 0,997-0,998, a u sladovini s visokim udjelom ekstrakta vodena aktivnost pada ispod 0,995 (Jakobsen i Piper., 1989).

2. Limitacija rasta stanice kisikom i dušikom

Zbog veće koncentracije inokuluma potrebno je osigurati veću koncentraciju otopljenog kisika na početku fermentacije potrebnu za sintezu sterola i nezasićenih masnih kiselina. Pri kraju fermentacije rast stanica limitiran je izvorom dušika u sladovni.

3. Toksičnost etanola:

Koncentracija etanola prelazi 7-8 % (vol/vol) što izaziva inhibiciju rasta i smrt stanice.

4. Djelovanjem hidrostatkog tlaka i CO₂

Djelovanjem tlaka i CO₂ povećava se udjel mrtvih stanica što se negativno odražava na brzinu fermentacije (Smart, 2008).

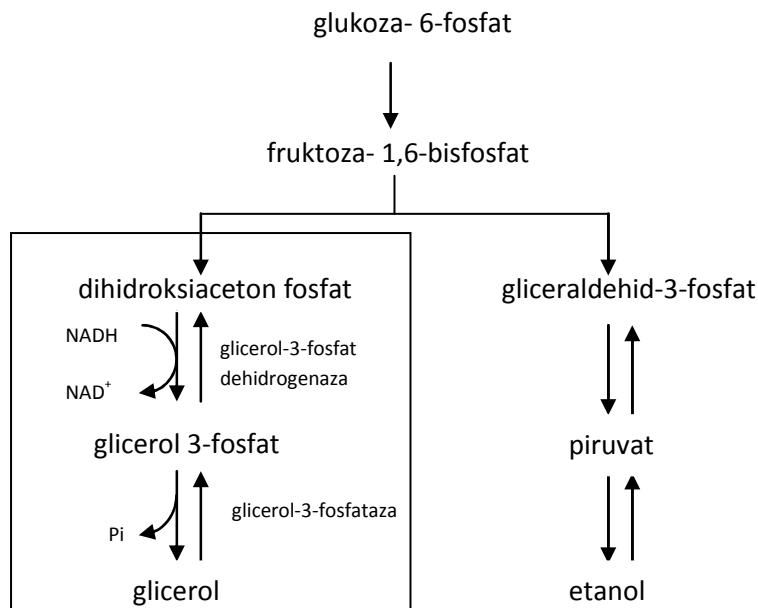
2.5. Fiziološki odgovor stanice izazvan stresom

Sinteza glicerola i trehaloze ima vitalnu ulogu u preživljavanju stanica kvasca izloženih visokom koncentracijom šećera i etanola.

2.5.1. Glicerol

Tijekom fermentacije sladovine s visokim udjelom ekstrakta stanica kvasca je izložena visokom osmotskom tlaku. Sintezom glicerola stanica kompenzira povećanje tlaka u okolini i istovremeno osigurava obnavljanje NADH koji se troši u reakciji sinteze etanola uz alkohol dehidrogenazu (Albertyn i sur., 1994). Glicerol nastaje redukcijom dihidroksiaceton fosfata u glicerol-3- fosfat uz NADH ovisnu glicerol-3- fosfat dehidrogenazu (slika 2).

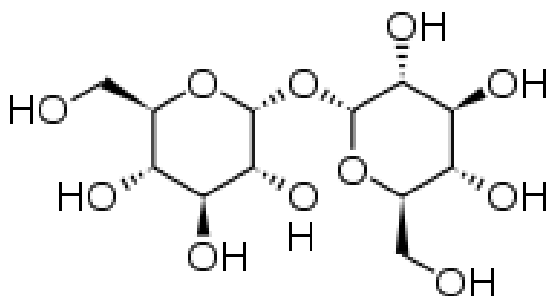
Količina glicerola proporcionalna je količini etanola.



Slika 2. Sinteza glicerola kvascu *S. cerevisiae* (Briggs i sur., 2004)

2.5.2. Trehaloza

Trehaloza (α -D-glucopiranozil α -D-glucopiranozid) je nereducirajući disaharid koji sadrži dvije molekule D-glukoze povezane α , α -1, 1- glikozidnom vezom (slika 3). Rasprostranjena je u različitim organizmima poput bakterija, funga, biljaka, insekata i beskraljčnjaka.



Slika 3. Trehaloza.

Dugo vremena se smatrano da je trehaloza u kvascu *S. cerevisiae* isključivo rezervni ugljikohidrat. Sadržaj trehaloze u pekarskom kvascu iznosi od 15-20% suhe tvari biomase, a 10% smatra se kritičnom donjom razinom. Količina trehaloze u laboratorijskim sojevima *S. cerevisiae* tijekom šaržnog uzgoja iznosi do 4-5% (D'Amore i sur., 1991; Argüelles, 2000). Koncentracija trehaloze se mijenja tijekom faza rasta. Tijekom eksponencijalne faze rasta koncentracija trehaloze je vrlo niska uslijed represije glukozom (Pidocke i sur., 2009).

Trehaloza se počinje nakupljati tijekom prijelaza iz eksponencijalne faze rasta u usporenu fazu rasta, a počinje se trošiti tijekom limitacije izvorom ugljika (Hounsa i sur., 1998).

Trehaloza ima izuzetno važnu ulogu u zaštiti stanice pri izlaganju visokom osmotskom tlaku, tijekom limitacije rasta stanice nekim nutrijentom, pri izlaganju stanice visokim temperaturama ili visokim koncentracijama etanola. Utvrđeno je da trehaloza pridonosi očuvanju strukture membrane tako da preuzima ulogu molekule vode i veže se na polarne skupine fosfolipida, pomaže održavanju native strukture proteina sprječavajući njihovu denaturaciju, te sprječava agregaciju denaturiranih proteina (Lucero i sur., 2000). Pri visokim koncentracijama etanola trehaloza se veže na polarne skupine fosfolipida u membrani smanjujući permeabilnost membrane (Hallsworth, 1998).

Udjel trehaloze u stanici za inokulaciju smatra jednim od važnih pokazatelja vitalnosti stanice kvasca prema kojoj se može predvidjeti njegova fermentacijska sposobnost (Guldfeldt i Arneborg, 1998).

Sintezu trehaloze katalizira enzimski kompleks koji se sastoji od četiri proteina:

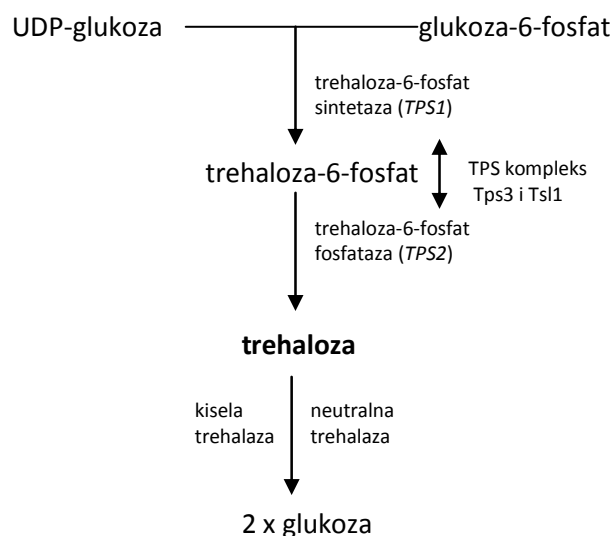
- trehaloza 6-fosfat sintetaza (Tps I) koja katalizira kondenzaciju glukoza 6-fosfata i UDP-glukoze u trehalozu 6-fosfat

- trehaloza 6-fosfat fosfataza (Tps2) katalizira reakciju defosforilacije trehaloze 6-fosfata.

- Tps3 i Tsl 1 proteini su regulatorne podjedinice proteinskog kompleksa.

Metabolički put sinteze i razgradnje trehaloze u stanici kvasca prikazan je na slici 4.

Hidrolizu trehaloze u stanici kataliziraju dva enzima: neutralna trehalaza i kisela trehalaza. Neutralna trehalaza nalazi se u citosolu, dok se kisela trehalaza nalazi na površini stanice ili u vakuoli (Shima i Takagi, 2009).



Slika 4. Sinteza i razgradnja trehaloze kvascu *S. cerevisiae* (Shima i Takagi, 2009).

2.6. Glikogen

Glikogen je polimer D-glukoze razgranate strukture. Lanci od 10-14 glukoznih jedinica povezani su α (1 \rightarrow 4) glikozidnom vezom, a na mjestima grananja glukozne jedinice su međusobno povezane α (1 \rightarrow 6) glikozidnim vezama. Na 12 glukoznih jedinica u molekuli glikogena dolazi 1 α (1 \rightarrow 6) glikozidna veza.

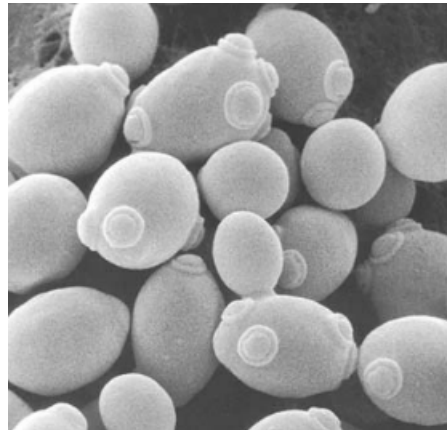
Glikogen je rezervni ugljikohidrat i izvor ugljika tijekom izgladnjivanja stanice na izvoru ugljika u podlozi. Smatra se jednim od pokazatelja vitalnosti stanica pivskog kvasca i služi kao izvor energije tijekom čuvanja matičnog kvasca između dvije fermentacije. U ovom periodu stanice mogu utrošiti od 30-40 % glikogena na endogeni metabolizam (Heggart i sur, 1999). Preostali glikogen stanice troše nakon inokuliranja u prisustvu kisika za sintezu sterola i nezasićenih masnih kiselina (Briggs i sur., 2004; Cahill i sur, 2000). Naime stanice ne mogu asimilirati šećer iz podloge zbog nefunkcionalnosti stanične membrane. Nakupljanje glikogena započinje pri kraju eksponencijalne faze zbog smanjenja koncentracije izvora dušika ali i drugih nutrijenata u sladovini uz relativno visoku koncentraciju neprevrelih fermentabilnih šećera. Kada se u potpunosti utroše fermentabilni šećeri u sladovini započinje razgradnja glikogena. Zbog toga je potrebno ukoloniti stanice kvasca iz fermentora i pohraniti ih na 0-2°C kako bi se spriječila prekomjerna razgradnja glikogena. Niski udjel glikogena u stanici posljedica je izlaganja stanica kisiku ili produljenog vremena čuvanja matičnog kvasca. Stanice kvasca s niskim udjelom glikogena imaju produljenu lag fazu rasta, te smanjenu brzinu rasta i brzinu fermentacije (Heggart i sur, 1999).

1.7. Pivski kvasac

Postoje dvije vrste pivskog kvasca, kvasac donjeg vrenja i kvasac gornjeg vrenja. Kvasac donjeg vrenja se primjenjuje u proizvodnji *lager* piva ili piva donjeg vrenja, a kvasac gornjeg vrenja u proizvodnji *ale* piva ili piva gornjeg vrenja (Priest i Stewart, 2006). Prva klasifikacija kvasaca se zasnivala na flokulacijskim karakteristikama kvasca odakle i potječe njihov naziv. U pravilu se kvasac gornjeg vrenja, nakon završenog vrenja nakuplja na površini mladog piva, dok se kvasac donjeg vrenja taloži na dnu fermentora. Kvasac gornjeg i donjeg vrenja pripadaju rodu *Saccharomyces*. Međutim prema fiziološkim i genetičkim svojstvima, ovi kvasci pripadaju različitim vrstama. Dok je kvasac gornjeg vrenja sličan pekarskom kvascu *S. cerevisiae*, kvasac donjeg vrenja (nekadašnji *S. carlsbergensis*) prema novijim taksonomskim istraživanjima svrstan u vrstu *S. pastorianus*. Vrsta *S. pastorianus* nastala je fuzijom genoma

ale kvasca *S. cerevisiae* s vrstom *S. eubayanus* (nekadašnji *S. bayanus*). Genom *S. pastorianus* je i do 60 % veći od genoma *S. cerevisiae* jer sadrži dva velika fragmenta roditeljske DNA. Većina genetičkog materijala *S. pastorianus* potječe iz *S. eubayanus*.(Montrocher i sur., 1998; Libkind i sur., 2011).

Stanice pivskog kvasca su okruglog do ovalnog oblika promjera 5-10 mikrometara. Tijekom aseksualnog ciklusa raznožavanja dolazi do stvaranja pupova, stanica kćeri. Nakon diobe stanica, na površini stanice majke ostaje ožiljak (slika 5).



Slika 5. Stanica kvasca s ožiljcima koji nastaju dijeljenjem stanica. (Anonymous 1)

1.8. Selekcija kvasaca i evolucijsko inženjerstvo

Pivarski sojevi kvasca su nastali prirodnom selekcijom kroz stoljeća u tradicijskom postupku proizvodnje piva u kojem je kvasac izdvojen na kraju fermentacije nanovo korišten neograničen broj puta. Međutim posljednjih četrdesetak godina s početkom razvoja procesa proizvodnje piva s povećanim sadržajem ekstrakta proces prirodne selekcije kvasca je zaustavljen. Pivari su izdvojili čiste kulture kvasca, koje koriste za pripremu inokuluma (Huuskonen i sur., 2010). U procesu proizvodnje piva biomasa kvasca najčešće se reciklira od 10-15 puta. Zbog toga sojevi pivskog kvasca koji se danas primjenjuju u proizvodnji piva nisu adaptirani na uvjete karakteristične za fermentaciju s povećanim udjelom ekstrakta (visoki osmotski tlak i visoka koncentracija etanola). Evolucijsko inženjerstvo (eng. evolutionary engineering) pokazalo se kao uspješna strategija i alternativa genetičkom inženjerstvu u poboljšanju karakteristika mikroorganizama posebno kada se radi o proizvodnji hrane i pića jer primjena genetički preinačenih mikroorganizama u Europi još uvijek nije dozvoljena. Premda je niz istraživanja pokazao da se može uz pomoć genetički preinačenih kvasaca dobiti pivo poboljšane kvalitete uz ekonomičniji proces proizvodnje, komercijalizacija ovih sojeva zasada nije moguća (Saerens i sur., 2010). Upotreba genetički modificiranih organizama

implicira brojna pitanja, posebice etička, socio-ekonomska, pitanje sigurnosti hrane i okoliša te pitanje neškodljivosti za ljudsko zdravlje.

Oponašajući prirodnu selekciju u evolucijskom inženjerstvu mutacije se uvode nasumično u genom stanice, a zatim sljedi selekcija mutanata s poboljšanim fenotipom. Iako do mutacija u genomu može doći spontano zbog pogrešaka u replikaciji i popravku DNA oštećenja, mutacije se induciraju uz pomoć kemijskih ili fizikalnih mutagena, rekombinacijom, i izmjenom jednog gena, gena čitavog metaboličkog puta ili čak čitavog genoma (Sauer, 2001). Za razliku od metaboličkog inženjerstva mutacije se uvode nasumično u čitavom genomu stanice. Stoga je često nemoguće odrediti koja je mutacija odgovorna za poboljšanje određenog fenotipa stanice (Nevoigt, 2008).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizam

U ovom radu korišten je pivski kvasac donjeg vrenja iz Zagrebačke pivovare (soj WT).

3.1.2. Sirovine za pripremu hranjivih podloga

Sirovine za pripremu hranjivih podloga navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Sirovine za pripremu hranjivih podloga.

| Naziv | Proizvođač |
|---|-------------------------------|
| Bacto-agar | Difco,USA |
| Kvašćev ekstrakt | Roth, Austrija |
| Maltoza | Roth, Austrija |
| Pepton | Roth, Austrija |
| Ugušćeni sladni ekstrakt (72% suhe tvari) | Ireks Aroma, Hrvatska |
| Sladovina, 18-20 % ekstrakta | Zagrebačka pivovara, Hrvatska |

3.1.3. Kemikalije

U ovom radu su korištene kemikalije navedene u tablici 2., te enzim naveden u tablici 3.

Tablica 2. Kemikalije korištene u istraživanju.

| Naziv | Proizvođač |
|--|---------------|
| ZnSO ₄ ·7 H ₂ O | Merck |
| Na ₂ CO ₃ , p.a. | Merck |
| 85 % H ₃ PO ₄ , | Merck |
| Metilensko plavo | Sigma Aldrich |
| Etil metilsulfonat | Sigma Aldrich |
| Natrij-hidrogenfosfat | Merck |
| Natrij-dihidrogenfosfat | Merck |
| Etanol (96 %) | Merck |
| Ledena octena kiselina | Merck |
| Cikoheksimid | Sigma |
| Antimicin | Sigma |
| Natrij-tiosulfat | Kemika |
| Natrij-acetat | Kemika |

Tablica 3. Enzim.

| Naziv | Proizvođač |
|-------------------------------------|------------|
| amiloglukozidaza iz <i>A. niger</i> | Sigma |

3.1.4. Hranjive podloge

3.1.4.1. Tekuće hranjive podloge

Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma s maltozom

Inokulum je uzgojen na podlozi koja je sadržavala 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 20 g/L peptona i 40 g/L maltoze.

Hranjive podloge za selekciju kvasaca s maltozom

Stanice kvasca nakon mutageneze naciijepljene su na podlogu koja je sadržavala 10 g/L kvašćevog ekstrakta, 20 g/L peptona i 120 g/L maltoze.

Sladovina s visokim udjelom ekstrakta

Sladovina s 25 % ekstrakta dobivena je otapanjem ugušćenog sladnog ekstrakta u sladovini priređenoj u Zagrebačkoj pivovari čiji sadržaj ekstrakta iznosio od 18-20 % ovisno o šarži. Ova podloga je korištena za fermentaciju u bioreaktoru.

Sladovina s 25 % ekstrakta za selekciju sojeva kvasaca pripređena je otapanjem ugušćenog sladnog ekstrakta u vodi.

Pri pripremi sladovine udjel sladnog ekstrakta određivan pomoću areometra (saharometra) pri 20°C. Nakon sterilizacije u podloge je dodano 0,2 mg/L cinka u obliku $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$.

3.1.4.2. Krute hranjive podloge

Sladni agar

Podloga sa sladnim agarom korištena je za održavanje radne kulture (u epruvetama), te za određivanje broja živih stanica stanica (u Petrijevim zdjelicama). Sladni agar sadržavao je 12 % ekstrakta i 10 g/L agara.

Nakon sterilizacije u podlogu sa sladnim agarom dodan je antimicin koncentracije 2 mg/L podloge.

Podloge za selekciju

Za selekciju kvasaca korištene su krute hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama sljedećeg sastava:

-sladovina s visokim udjelom ekstrakta (25 %): dobivena otapanjem ugušćenog sladnog ekstrakta u vodi uz dodatak 10 g/L agara

-podloga s etanolom: dobivena razrijeđivanjem sladovine s vodom na 12 % ekstrakta uz dodatak 10 g/L agara; nakon sterilizacije podloge dodan je etanol (10 % vol/vol)

3.2. Aparature

U ovom radu uz laboratorijsko posuđe korištena je sljedeća oprema:

- bioreaktor s mješalom (Biostat A plus, „Sartorius“, Njemačka)
Bioreaktor s turbinskim miješalom ukupnog volumena 2 L. Opremljen je sustavom za regulaciju temperature, korekciju pH i praćenje koncentracije otopljenoga kisika. Bioreaktor sterilizira u autoklavu zajedno s podlogom.
- Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti („Shimadzu CLASS-VP LC-10A“, „Shimadzu“, Japan)
- Centrifuga („Harrier 18/80“, „Sanyo“, Velika Britanija)
- Tresilica („RM 71“ B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka)
- Sušionik („Instrumentaria ST-50“, Hrvatska)

- Analitička vaga („Shimadzu“, Japan i tehnička vaga „Technica ET-1111“, Slovenija)
- Mikroskop („CX21“, „Olympus“, Japan)
- Areometar (saharometar)
- Peristaltičke pumpe („H-8604 Chemap AG“)
- Vorteks mješalica („Technica ET-1111“, Slovenija)
- Hladnjak i zamrzivač

3.2. Metode i uvjeti uzgoja

3.2.1. Priprema inokuluma

Čista kultura kvasca *Saccharomyces cerevisiae* održavana je na krutoj hranjivoj podlozi za uzgoj inokuluma.

Inokulum za fermentaciju u bioreктору pripremljen je u dva stupnja. Kvasac s kose podloge nacijepljen u 200 mL podloge za uzgoj inokuluma (Erlenmeyerova tikvica od 500 mL). Nakon jednog dana uzgoja na rotacijskoj tresilici pri 180 okretaja/min i temperaturi 28°C, 1 mL kulture nacijepljen je u 200 mL podloge za uzgoj inokuluma u više Erlenmeyerovih tikvica. Nakon 48 sati tikvice s naraslom kulturom stavljene su hladnjak na +4°C preko noći da se kvasac istaloži. Tekući dio prevrele podloge je dekantiran, a biomasa je resuspendirana u 200 mL podloge za fermentaciju.

3.2.2. Fermentacija podloge s visokim udjelom sladnog ekstrakta u laboratorijskom bioreктору

Neposredno prije nacijepljivanja radne kulture, sterilna sterilna hranjiva podloga je ohlađena na zadanu temperaturu vrenja od 19°C i zasićena kisikom iz zraka propuštanjem zraka kroz filter za zrak uz rotaciju miješala (500 okretaja/min) kroz dvadesetak minuta. Potom je dotok zraka zatvoren, broj okretaja smanjen na 50 okretaja/min kako bi se stanice kvasca bile jednakomjerno resuspendirane u podlozi. Otvor za izlazni zrak postavljena je vrelnjača kako bi se spriječio otapanje kiskika u zraka u podlozi. Uzorci su izuzimani stvaranjem natlaka u bioreктору uvođenjem dušika kroz filter za ulazni zrak. Tijek šaržnog procesa fermentacije sladovine praćen je uzimanjem uzoraka svakih 24 sata i praćenjem on line parametara bioprocasa (temperatura, pH, postotak zasićenja kisikom).

3.3. Mutagenеза i adaptacija kvasca

3.3.1. Indukcija mutacija s etil metansulfonatom

Stanice kvasca tretirane su s kemijskim mutagenom etil metansulfonatom (EMS). Prekonoćna kultura kvasca uzgojena je u 100 mL podloge za uzgoj inokuluma na tresilici pri 150 okretaja/min i 28°C. Određen je broj stanica po mililitru podloge u Thomaovoj komorici, te je izračunat volumen podloge koji sadrži približno 3×10^8 stanica. Izračunati volumen podloge prenesen je u tri kivete, te su stanice istaložene centrifugiranjem pri 2500 okretaja/min. Supernatant je dekantiran, biomasa je dva puta isprana s hladnom deioniziranom vodom, a zatim s 0,1 M fosfatnim puferom (pH= 7). Nakon uklanjanja supernatanta stanice su resuspendirane u 5 mL 0,1 M fosfatnog pufera (pH= 7), a suspenzija prelivena u staklene bočice s gumenim čepom. U prvu bočicu dodano je 100 µL, a u drugu bočicu 200 µL EMS-a. Treća kontrolna bočica nije sadržavala mutagen. Smjesa je resuspendirana na vibromikseru 1 min, a zatim inkubirana na sobnoj temperaturi na tresilici pri 180 okretaja/min. Nakon 2 sata inkubacije EMS je inaktiviran dodatkom 5 %-tnog natrijevog tiosulfata. Biomasa je istaložena centrifugiranjem pri 2500 okretaja /min, supernatant dekantiran, a stanice su još dva puta isprane s 5 %-tnom otopinom natrijevog tiosulfata. Isti postupak je primjenjen i na kontrolni uzorak.

3.3.2. Selekcija soja kvasca s poboljšanim fermentativnim karakteristikama

Stanice tretirane EMS-om su resuspendirane u 20 mL tekuće podloge za selekciju u epruveti zatvorenom s vrelnjačom. Napredovanje fermentacije praćeno je mjerenjem mase kulture i uspoređivanjem smanjenja mase podloge kultura 1 i 2 i kontrolne kulture. Kulture su uzgajane pri 21°C četiri dana (1. fermentacija), a zatim su ostavljene na +4°C preko noći. Nakon što je dekantirane fermentirane podloge, istaložena biomasa na dnu epruveta resuspendirana je u 35 mL sladovine s povećanim udjelom ekstrakta (2. fermentacija). Inokulirane podloge su inkubirane na tresilici uz rotaciju od 150 okretaja/min dvadesetak minuta, a zatim prelivene u epruvete i zatvorene s vrelnjačom. Nakon osmog dana uzgoja kulture su ostavljene na +4°C preko noći. Sutradan prevrela sladovina je dekantirana, a biomasa resuspendirana u 230 mL sladovine s visokim sadržajem ekstrakta (3. fermentacija). Nakon miješanja kultura na tresilici (150 okretaja/min dvadesetak minuta), kulture su prelivene u menzure (od 250 mL) i

začepljene s vrelnjačom. Napredovanje fermentacije praćeno je kao i u prethodnim fermentacijama. Prema prethodno opisanom postupku provedeno je još pet fermentacija s 230 mL sladovine s 25 % ekstrakta. Posljednjih šest fermentacija trajalo je od 14-16 dana. Nakon svake fermentacije biomasa je izdvojena centrifugiranjem pri 2500 okretaja/min kroz 10 min, a potom cjelokupna količina izdvojene biomase korištena u narednim fermentacijama. Broj stanica po mililitru podloge na kraju svake fermentacije određivan je naciyepljivanjem određenog decimalnog razrijeđenja na sladni agar u Petrijevim zdjelicama. Također je na kraju svake fermentacije izračunato ukupno smanjenje mase podloge, te je izračunat omjer smanjenja mase kulture 1 (Δm_{K1}) odnosno 2 (Δm_{K2}) i smanjenja mase kontrolne kulture (Δm_K) oznaćeno sa simbolom $w_{\Delta m_{K1}/\Delta m_K}$ tj. $w_{\Delta m_{K2}/\Delta m_K}$.

Nakon 7. i 8. fermentacije izdvojeni su alikvoti suspenzije biomase po 1 mL, resuspendirani u glicerolu i pohranjeni na -20°C za idući korak, postupak selekcije.

Pohranjena kultura na -20°C resuspendirana je u 100 mL podloge za selekciju, te ostavljena na $+4^{\circ}\text{C}$ dva dana. Odgovarajuća decimalna razrijeđenja naciyepljena su na krute podloge za selekciju s povećanim sadržajem sladnog ekstrakta i etanolom. Naciyepljene podloge inkubirane su na 25°C u anaerobnim uvjetima. Nekoliko tisuća naraslih kolonija analizirano je s obzirom na brzinu rasta kolonije. Pedeset i dvije kolonije koje su prema subjektivnoj procjeni promatraća najbrže rasle zatim su naciyepljene u 5 mL tekuće podloge za uzgoj inokuluma, te su uzgajane dva dana na tresilici pri 150 okretaja/min i 25°C . Kulture su ostavljene na $+4^{\circ}\text{C}$ preko noći. Sutradan je dekantirana fermentirana sladovina, a kvasac resuspendiran u 15 mL sladovine s 25 % ekstrakta. Kultura je uzgajana u epruveti s vatenim ćepom (semianerobni uvjeti) pri temperaturi 25°C tjedan dana. Svakodnevno je mjerena masa kulture, te je izračunato smanjenje mase na temelju koje je procjenjena brzina fermentacije. Osmam kultura mutanata koji su u ovoj fermentaciji pokazali veću brzinu fermentacije i veće ukupno smanjenje mase kulture u odnosu na soj WT. Nakon izolacije čiste kulture provedene su dvije fermentacije u nizu sa sladovinom s 25 % ekstrakta. Jedna kolonija za svaki izolirani soj kvasca naciyepljena je u 5 mL tekuće podloge za uzgoj inokuluma u epruvetama. Nakon dva dana uzgoja na tresilici pri 150 okretaja/min i 25°C kulture su ostavljene na $+4^{\circ}\text{C}$ preko noći da se istaloži biomasa. Fermentirana sladovina je dekantirana, a biomasa resuspendirana u 20 mL sladovine. Kultura je uzgajana u epruveti šest dana pri temperaturi od 25°C . Brzina fermentacije sladovine praćena je od mjerenjem mase kulture tijekom uzgoja. Nakon završene fermentacije kulture su stavljene na $+4^{\circ}\text{C}$ preko noći. Narasla biomasa iz prethodne fermentacije nakon dekantiranja prevrele sladovine je resuspendirana u 38 mL sladovine s povećanim udjelom ekstrakta. Fermentacija je provedena u epruvetama zatvorenim

vreljnjačama. Prema prethodno opisanom postupku fermentacije su ponovljene još dva puta, te je izračunata prosječna vrijednost smanjenja mase kultura (Δm).

3.4. Analitičke metode

3.4.1. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase

U staklene kivete dodano je po 10 mL prevrele sladovine. Biomasa je istaložena centrifugiranjem 10 minuta pri 2500 okretaja/min. Supernatant je pohranjen u hladnjaku (-20°C), a u njemu je naknadno određena koncentracija šećera i nastalog etanola i glicerola. Biomasa se po potrebi ispirana 2-3 puta s fiziološkom otopinom kako bi se uklonio neprevreli šećer. Isprana biomasa prvo je osušena na 65°C kroz 24 sata, a zatim još 2 sata pri temperaturi od 105°C do konstantne mase. Koncentracija biomase izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$X = \frac{\text{masa kivete s biomasom} - \text{masa prazne kivete}}{0,01} \text{ (g/L)}$$

3.4.3. Određivanje broja živih stanica u hranjivoj podlozi

Na Petrijeve ploče sa sladnim agarom, nacijepljeno je odgovarajuće decimalno razrijeđenje fermentirane podloge. Za svaki uzorak nacijepljene su tri paralele. Kultura je 2-3 dana uzgajana na 28°C . Narasle kolonije su izbrojane te je izračunata prosječna vrijednost broja naraslih stanica na tri Petrijeve ploče. Izračunat je broj živih stanica po mililitru podloge.

3.4.3. Određivanje udjela živih stanica u hranjivoj podlozi tijekom uzgoja

Tijekom uzgoja određivan je broj živih stanica kvasaca bojanjem s metilenskim plavim. Određen je broj živih stanica (nebojane) i broj mrtvih stanica (plavo obojane), te je izračunat udjel živih stanica.

3.4.4. Određivanje šećera i metabolita pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Priprema uzorka za analizu

Neosredno prije analize u uzorcima su djelomično istaloženi proteini dodatkom 10%-tne otopine $ZnSO_4 \times 7H_2O$. Jednaki volumeni supernatanta i otopine $ZnSO_4 \times 7H_2O$ dodani su u Eppendorf kivetu te su pomiješani na vorteksu 30 sekundi. Nakon 30 min inkubacije pri sobnoj temperaturi uzorak je centrifugiran 10 minuta pri 10 000 okretaja/ min i $+4^\circ C$. Supernatan je razrijeđen s vodom u omjeru 1:10, filtriran kroz filter veličine pora 0,2 mm (Sartorius) te dalje analiziran na HPLC-u. Za pripremu svih otopina korištena je redestilirana voda čija je vodljivost iznosila manje od $1\mu S$.

Određivanje koncentracija šećera i produkata metabolizma

Za određivanje koncentracije maltotrioze, maltoze, trehaloze, glukoze, fruktoze, glicerola i etanola tijekom procesa korišten je uređaj Shimadzu CLASS-VP LC-10A_{VP}. Uređaj se sastoji od crpke (LC-10AD_{VP}), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10AD_{VP}), uređaja za grijanje kolone (CTO-10A_{VP}), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona SupelcogelTM C-610H; 30 cm x 7,8 mm ID, 9 μm) s predkolonom (SupelcogelTM H; 5 cm x 4,6 mm ID, 9 μm), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10A_{VP}) i računalnog programa za kromatografiju. Kao mobilna faza korištena je otopina H_3PO_4 (0,1% vol/vol) u vodi. Volumen analiziranog uzorka iznosio je 20 μL , a protok mobilne faze od 0,5 mL min⁻¹. Razdvajanje komponenti uzorka na koloni odvijalo pri temperaturi od 30 °C. Analiza je trajala 30 min, a svaki uzorak je analiziran dva puta. Dobiveni kromatogrami analizirani su uz pomoć računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Vrijeme zadržavanja pojedinih komponenti navedeni su u tablici 3.

Koncentracija pojedinih komponenti izračunata je prema jednadžbi baždarnog pravca dobivenog za otopine standardna svake navedene komponente (tablica 4.).

Tablica 3. Vrijeme zadržavanja pojedinih komponenti na koloni (t_R).

| Standard | Vrijeme zadržavanja t_R (min) |
|-------------|------------------------------------|
| Maltotrioza | 10,747 |
| Maltoza | 11,713 |
| Trehaloza | 12,090 |
| Glukoza | 12,837 |
| Fruktoza | 13,527 |
| Glicerol | 18,718 |
| Etanol | 25,505 |

Tablica 4. Baždarni pravci za standardne otopine šećera i metabolita.

| Standard | Baždarni pravac |
|--------------------|---------------------------|
| Maltotrioza (g/L) | $y = 336803 x + 16852$ |
| Maltoza (g/L) | $y = 317570 x + 58302$ |
| Trehaloza (g/L) | $y = 317995 x - 3338,7$ |
| Glukoza (g/L) | $y = 321277 x - 8505,1$ |
| Fruktoza (g/L) | $y = 304495 x + 10910$ |
| Glicerol (g/L) | $y = 264070 x - 1211$ |
| Etanol (% vol/vol) | $y = 1095980 x - 9848,17$ |

3.4.5. Određivanje udjela glikogena i trehaloze u stanicama

Udjel trehaloze i glikogena u kvascu određen je prema metodi Parrou i Françoisa (1997). Tijekom uzgoja u bioreaktoru izuzimana su po uzorka fermentirane sladovine, jedan za određivanje trehaloze, a drugi za određivanje glikogena. Biomasa je izdvojena centrifugiranjem pri 2500 okretaja/min pri 0°C, te isprana tri puta s hladnom demineraliziranom vodom. Uzorci biomase su pohranjeni na -20°C.

Nakon otapanja uzoraka na ledu, na svakih 10 mg suhe tvari biomase dodano je 0,25 mL 1 M Na₂CO₃. Biomasa je resuspendirana i staljena u kipuću vodenu kupelj. Trehaloza se ekstrahirala 20 min, dok je ekstrakcija glikogena trajala 3 sata. Uzorci su ohlađeni, a zatim su centrifugirani pri 5000 okretaja/min. Supernatanti staničnih ekstrakta korišteni su u analizi.

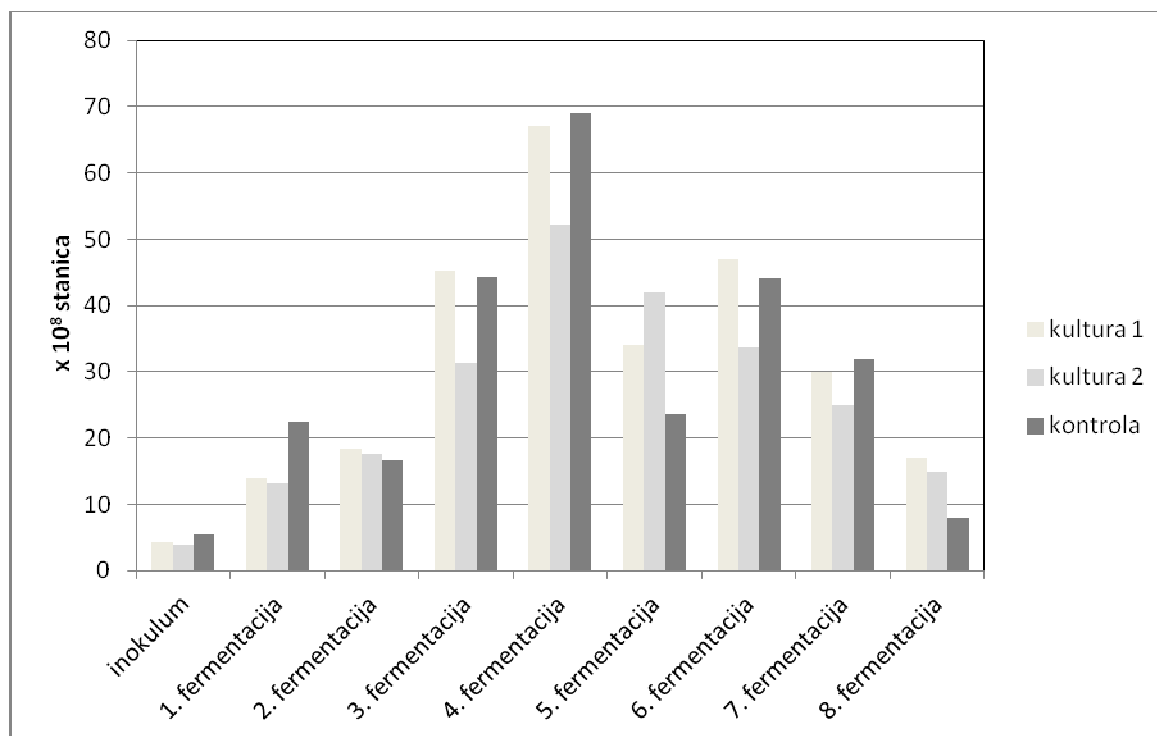
Koncentracija trehaloze u supernatantima određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti nakon višekratnog taloženja proteina u uzorku s $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Udjel trehaloze u stanci izražen je kao omjer mase trehaloze i mase suhe tvari biomase u uzorku.

U uzorke za određivanje glikogena na svakih 0,25 mL 1 M Na_2CO_3 dodanih za ekstrakciju dadano je 0,15 mL 1 M octene kiseline i 0,6 mL 0,2 M natrij acetata (pH=5,2). Glikogen je hidroliziran dodatkom amiloglukozidaze (1,2 U/mL) pri 57°C preko noći. Zatim su istaloženi proteini višekratnim taloženjem s $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a koncentracija glukoze određena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Udjel glikogena u stanci izražen je kao omjer mase glukoze i mase suhe tvari biomase u uzorku.

4. REZULTATI

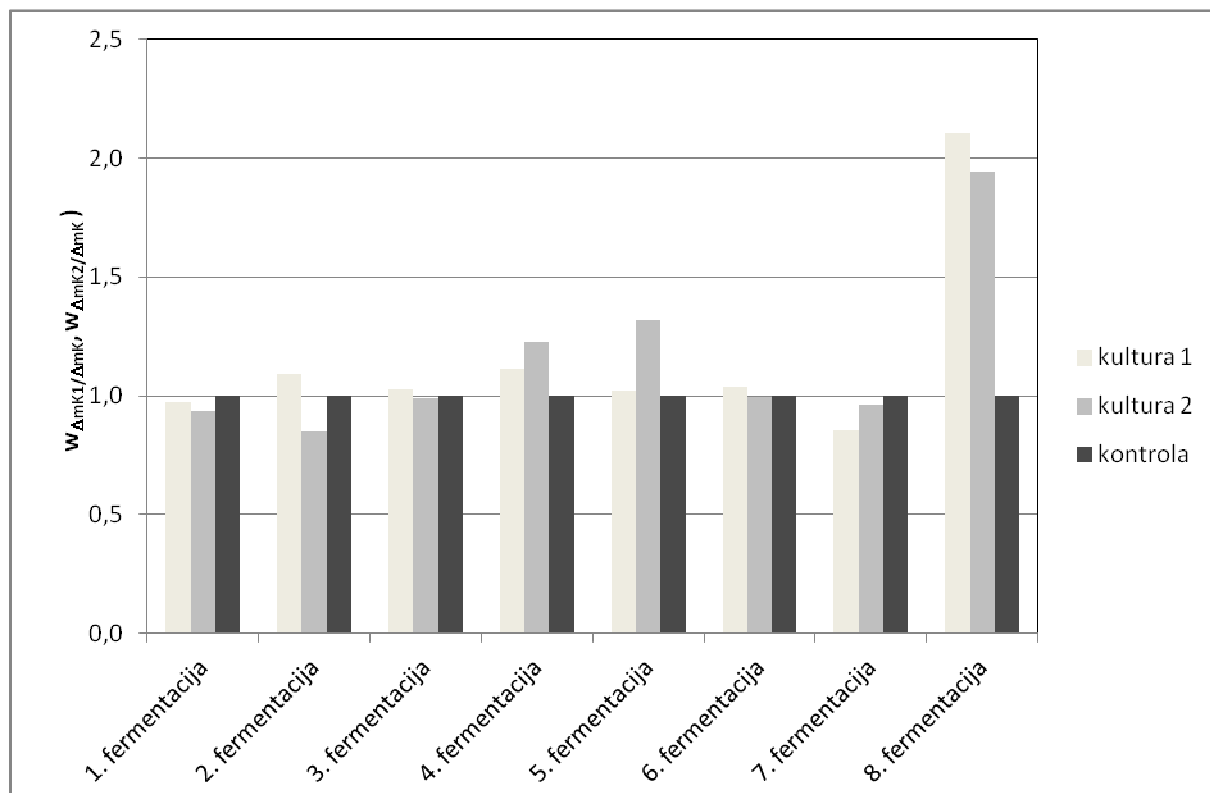
4.1. Selekcija sojeva kvasca s poboljšanim fermentativnim karakteristikama

Komercijalni pivski kvasac donjeg vrenja (soj WT) tretiran je s kemijskim mutagenom etil metansulfonatom. Mutirane stanice (kultura 1 i kultura 2) potom su naciepljene u tekuću podlogu za selekciju s visokom koncentracijom maltoze, a uzgoj je proveden u anaerobnim uvjetima (1. fermentacija). Brzina fermentacije praćena je mjerenjem mase kulture koja se tijekom uzgoja smanjivala zbog nastajanja CO₂ koji nastaje anaerobnom razgradnjom šećera u do etanola (glukoza, fruktoza, saharoza, maltoza i maltotrioza). Značajno usporavanje smanjenja mase kultura nastupilo je četvrtog dana uzgoja, te je kultura stavljena na +4°C preko noći. Provedeno je još sedam uzastopnih fermentacija u nizu, u kojima je cjelokupna biomasa istaložena nakon svake fermentacije korištena narednoj fermentaciji. Druga fermentacija trajala je osam dana, a sve naredne 14-16 dana. Iako posljednjih 7-8 dana fermentacije (3.-8. fermentacija) nije došlo do značajnijeg smanjenja mase podloge, fermentacija je produžena kako bi stanice bile duže vrijeme izložene visokim koncentracijama etanola. Na slici 6 prikazan je ukupan broj stanica u inokulumu, te na kraju svake pojedine fermentacije za kulture 1 i 2 tretirane s EMS-om, te kontrolnu kulturu (soj WT).



Slika 6. Ukupan broj stanica po mililitru podloge u inokulumu i na kraju osam fermentacija tijekom postupka selekcije kvasca na sladovini s 25% ekstrakta.

Zbog relativno malih razlika u izračunatim brzinama fermentacije kultura 1 i 2 i kontrolne kulture kao kriterij za procjenu uspješnosti fermentacije uzet je omjer smanjenja mase kulture 1 odnosno kulture 2 i smanjenja mase kontrolne kulture na samom kraju svake fermentacije $w_{\Delta mK1/\Delta mK}$ tj. $w_{\Delta mK2/\Delta mK}$ (slika 7).



Slika 7. Vrijednost omjera smanjenja mase kulture 1 odnosno kulture 2 i smanjenja mase kontrolne kulture ($w_{\Delta mK1/\Delta mK}$ tj. $w_{\Delta mK2/\Delta mK}$) tijekom osam uzastopnih fermentacija u sladovini s 25 % ekstrakta.

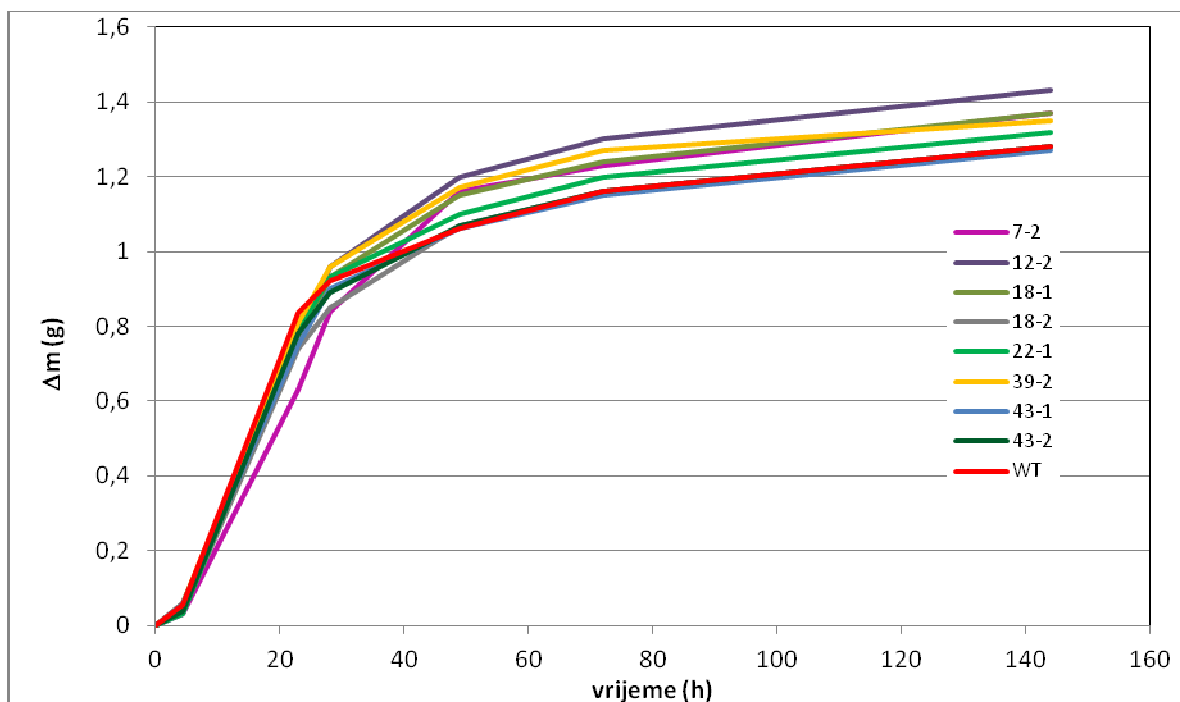
S uzorcima kulture 1 i 2 sačuvanima na kraju 7. i 8. fermentacije proveden je postupak selekcije kvasca. Kulture su naciyepljene na krute selektivne podloge s visokim udjelom ekstrakta i s etanolom. Kolonije su postale vidljive nakon dva dana rasta na podlozi visokim udjelom ekstrakta, a tek nakon četiri dana na podlozi s etanolom. Analizirano je nekoliko tisuća kolonija mutanata kvasca (mutacije inducirane s EMS-om ili spontano inducirane). Nekoliko najvećih kolonija precijepljeno je na obje krute selektivne podloge u Petrijevim zdjelicama na kojima je naciyepljen i soj WT. Rast kolonija izoliranih mutanata kvasca uspoređivan je međusobno i sa sojem WT. Izdvojeno je pedeset i dva mutanata koji su prema provedenim testovima pokazali najbrži rast na krutim selekcijskim podlogama. Brzina fermentacije određena je tijekom uzgoja u tekućoj sladovini s 25% ekstrakta. Od pedeset dva

mutanta podvrgnuta ovom testu samo je osam pokazalo veću brzinu fermentacije i veće ukupno smanjenje mase podloge na kraju fermentacije u odnosu na soj WT. Zatim su izolirane su čiste kulture osam mutanata kvasca nacijepeljivanjem na podlogu za uzgoj inokuluma s cikloheksimidom. Nazivi selekcioniranih mutanata su: 7-2, 12-2, 18-1, 18-2, 22-1, 39-2, 43-1 i 43-2.

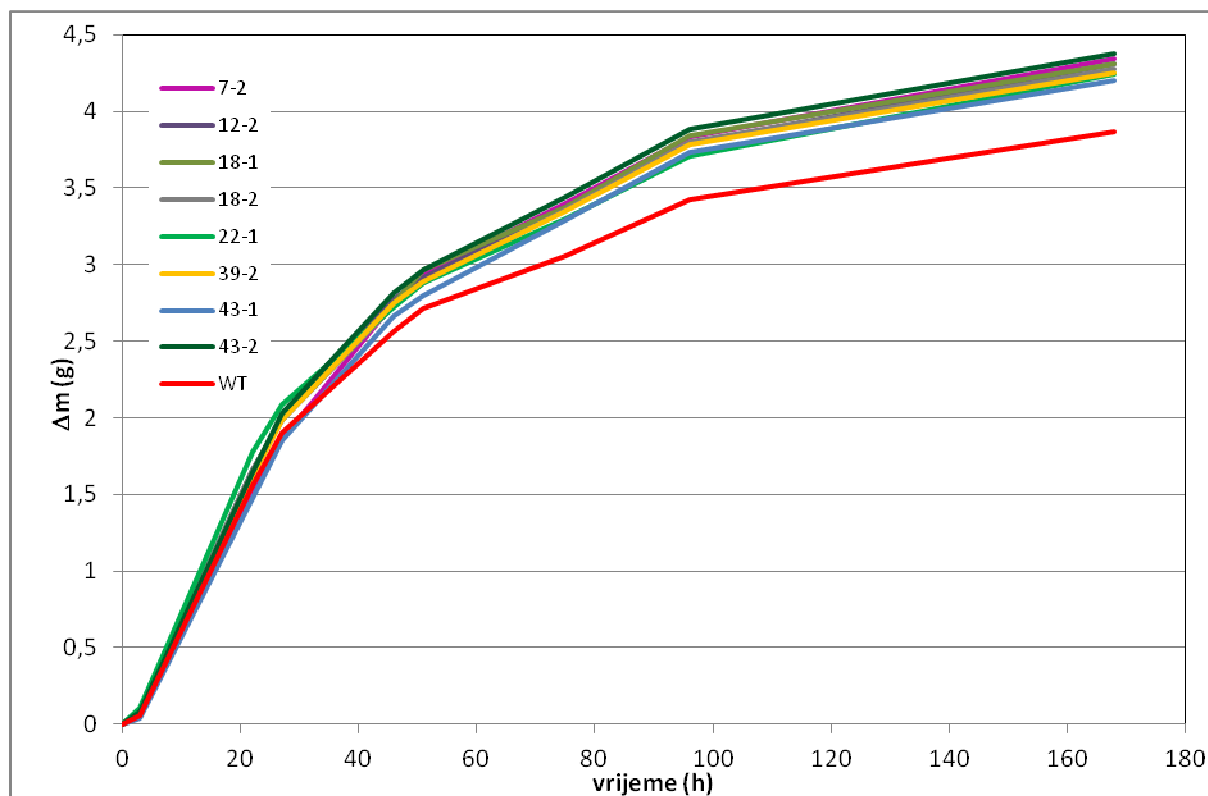
4.2. Određivanje brzine fermentacije sladovine s izoliranim mutantima kvasca

Da bi se potvrdilo stvarno poboljšanje fermentacijskih svojstava osam izoliranih mutanata provedene su dvije fermentacije nizu s tekućom sladovinom sa 25 % ekstrakta. Prva fermentacija trajala je šest dana, a brzina potrošnje šećera praćena je određivanjem smanjenja mase podloge. Na slici 8 je prikazana prosječna vrijednost smanjenja mase kulture iz tri ponovljena pokusa.

U drugoj fermentaciji kao inokulum je korištena biomasa izdvojena nakon prve fermentacije. Na slici 9 prikazana je prosječna vrijednost smanjenja mase sladovine tijekom fermentacije s kulturama mutanata kvasca i sa sojem WT.



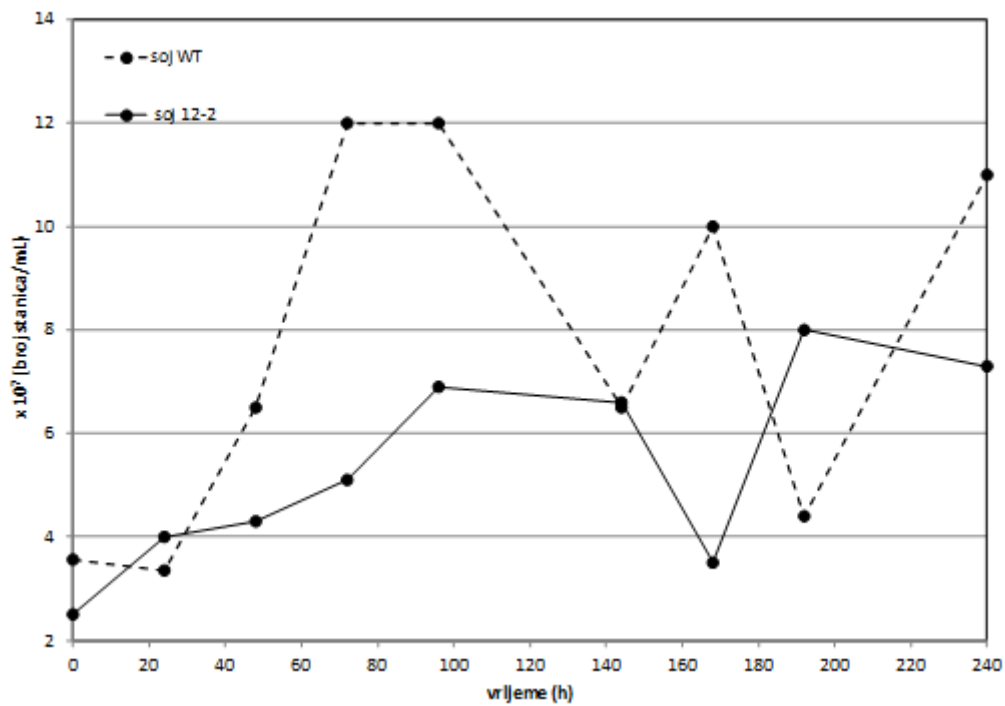
Slika 8. Smanjenje mase kultura (Δm) tijekom 1. fermentacije.



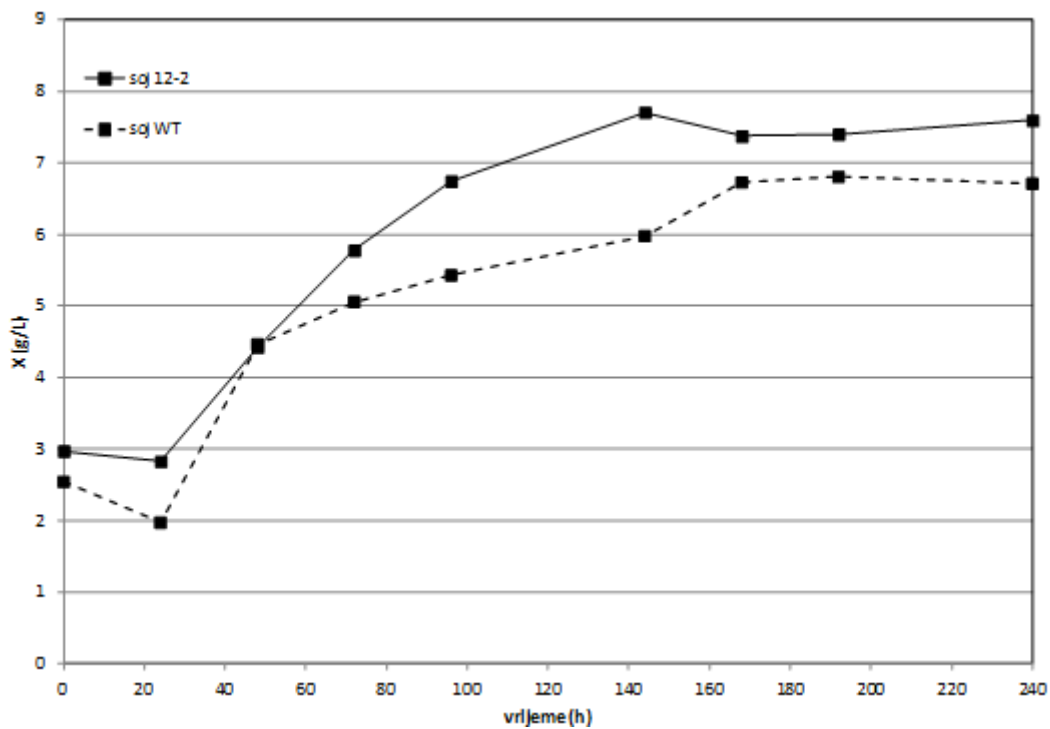
Slika 9. Smanjenje mase kultura (Δm) tijekom 2. fermentacije.

4.3. Fermentacija sladovine s visokim udjelom ekstrakta u bioreaktoru

Fermentacija sladovine s povećanim udjelom ekstrakta provedena je u bioreaktoru korisnog volumena 1,7 L. Neposredno prije inokulacije, sladovina je zasićena s kisikom iz zraka. Nakon inokulacije dotok zraka zatvoren, a na filter za izlazni zrak iz bioreaktora spojena je vrelnjača kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Uzgoj je proveden sa sojem WT i mutantom 12-2 koji je u prethodnom eksperimentu imao najveću brzinu fermentacije (slika 9). Tijekom uzgoja su izuzimani uzorci podloge u kojima je određivan broj živih stanica po mililitru podloge, koncentracija suhe tvari, koncentracija šećera glukoze, fruktoze, maltoze i maltotrioze, produkata etanola i glicerola, te udjel trehaloze i glikogena u stanici. Na slici 10 i 11 prikazane su promjene broja živih stanica po mililitru podloge i koncentracija suhe tvari biomase soj 12-2 i WT tijekom fermentacije pri temperaturi 17°C. početni broj stanica za soj 12-2 odgovara preporučenoj vrijednosti od $25 \cdot 10^7/\text{mL}$ dok je ta vrijednost za soja WT bila $35 \cdot 10^7/\text{mL}$. Također koncentracija biomase za soj 12-2 bila je za 20 % viša u odnosu na soj WT. Udjel živih stanica u podlozi na kraju fermentacije sa sojem 12-2 iznosio je 90 % dok je sa sojem WT udjel živih stanica bio 87 %.



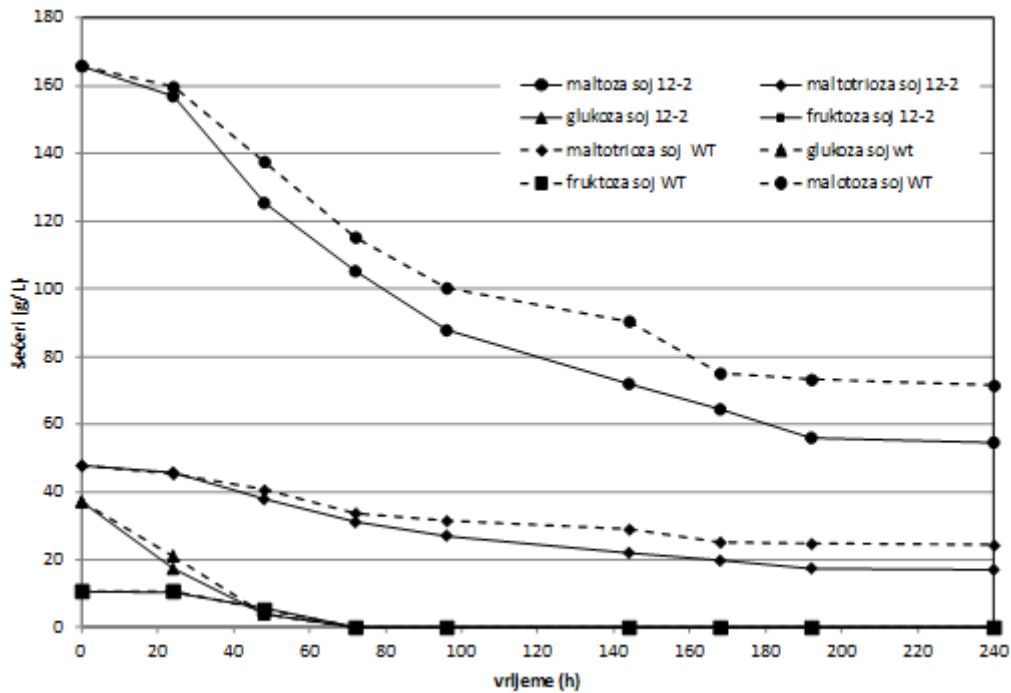
Slika 10. Promjena broja živih stanica kvasca po mililitru podloge tijekom fermentacije u bioreaktoru.



Slika 11. Promjena koncentracije suhe tvari tijekom fermentacije bioreaktoru.

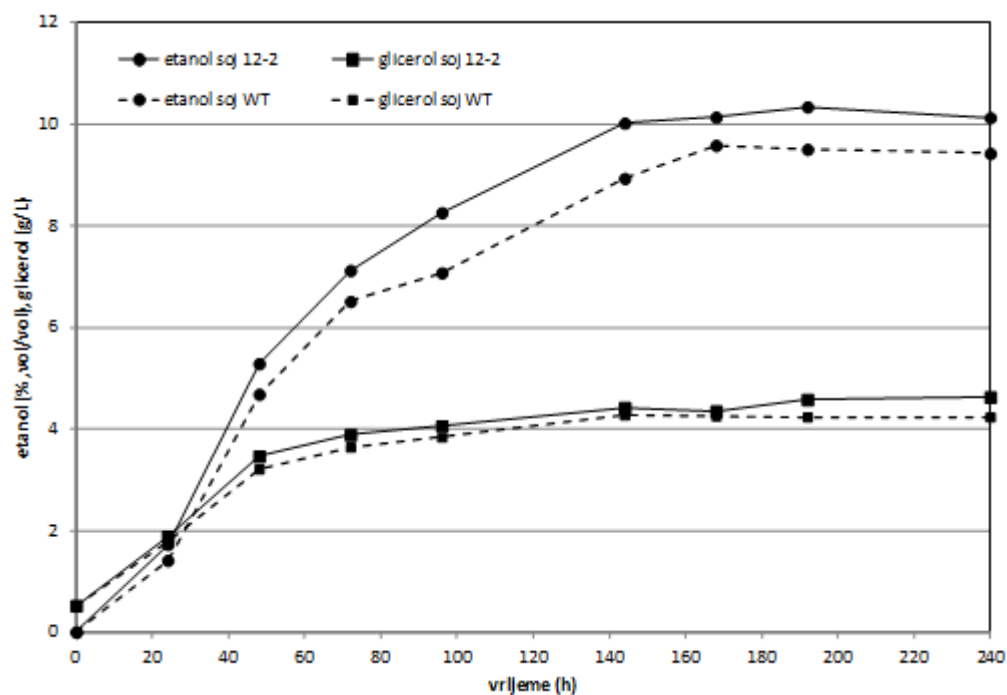
Brzina potrošnje fermentabilnih šećera (glukoze, fruktoze, maltoze i maltotrioze) bila je veća za soj 12-2 u odnosu na soj WT što je vidljivo iz slike 12. Vrijednost prividnog ekstrakta određen areometrom na kraju fermentacije iznosio je 10,5 % za soj 12-2 i 13 % za soj WT.

Tijekom fermentacije određivana je kinetika nastajanja produkata metabolizma, etanola i glicerola (slika 12).

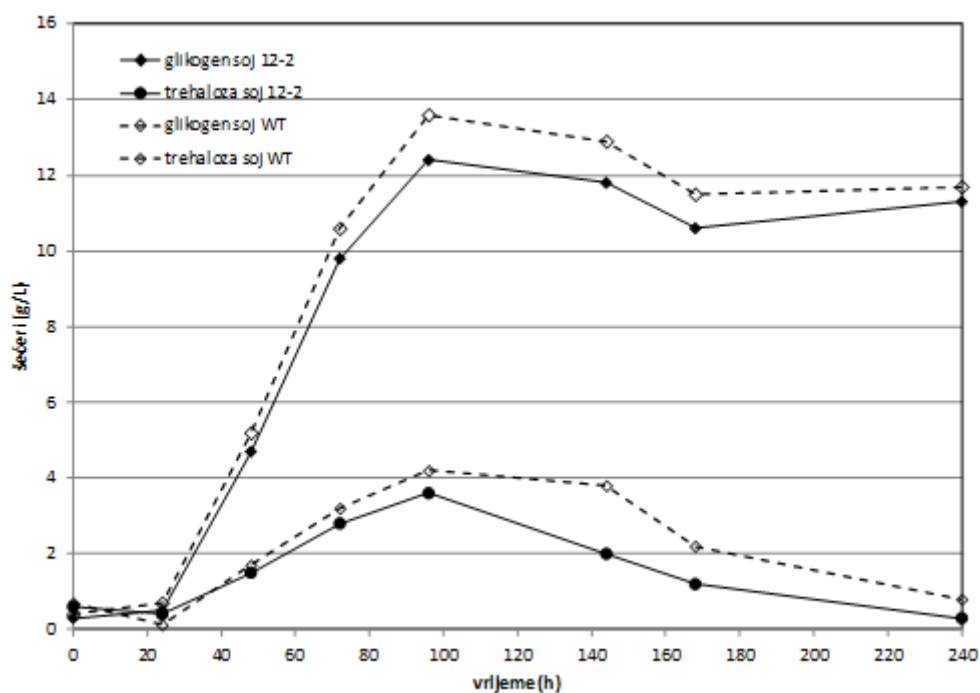


Slika 12. Promjena koncentracije fermentabilnih ugljikohidrata (maltoze, maltotrioze, glukoze i fruktoze) tijekom fermentacije sladovine s povećanim udjelom ekstrakta u bioreaktoru.

Tijekom fermentacije određivan je udjel glikogena i trehaloze u stanici (slika 14).



Slika 13. Promjena koncentracije glicerola i etanola u podlozi tijekom fermentacije u bioreaktoru.



Slika 14. Promjena udjela glikogena i trehaloze u stanici tijekom fermentacije u bioreaktoru.

5. RASPRAVA

5.1. Poboljšanje fermentacijskih karakteristika pivskog kvasca primjenom evolucijskog inženjerstva

Pivski kvasac donjeg vrenja (soj WT) primjenjuje se u proizvodnji piva iz sladovine sa 18 % ekstrakta. Nakon pet dana uzgoja koncentracija fermentabilnih šećera s početnih 155 g/L pada na 10 g/L (8 % maltoze i 2% maltotrioze), a volumni udjel etanola iznosi 8,5 % (rezultati nisu prikazani). Značajne uštede u proizvodnji piva mogu se ostvariti povećanjem sadržaja ekstrakta u sladovini (Bamforth, 2003; Blicek i sur., 2007; Huuskonen i sur., 2010). U cilju poboljšanja fermentativnih svojstava pivskog kvasca u sladovini s vrlo visokim udjelom ekstrakta (25 %) primjenili smo tzv. evolucijsko inženjerstvo (Sauer, 2001). Kvasac je tretiran s kemijskim mutagenom EMS-om, a zatim su mutirane stanice uzgojene u podlozi s visokom koncentracijom maltoze koja je i najzastupljeniji šećer u sladovini (Stewart, 2004). U idućim fermentacijama uvjeti uzgoja bili su slični onima u proizvodnji piva. Tako je za uzgoj korištena sladovina s 25 % ekstrakta, a biomasa nakon svake fermentacije izdvojena i korištena u idućoj fermentaciji. Međutim ova podloga nije u potpunosti selektivna jer mutanti i roditeljski soj (soj WT) koji vrlo sporo previru sladovinu mogu preživjeti u podlozi zajedno sa stanicama koje znatno brže previru sladovinu. Zbog nedovoljne količine otopljenog kisika potrebnog za sintezu sterola i nezasićenih masnih kiselina i limitacije rasta izvorom dušika tijekom fermentacije stanice se dijele 1-2 puta. Zato je malo vjerojatno da će mutanti s boljim fermentativnim karakteristikama brojčano prevladati u populaciji kvasaca odmah nakon prve fermentacije. Trajanje fermentacije je produljeno kako bi stanice bile što duže izložene visokim udjelima etanola koja prelazi 9 %. Uzastopnim recikliranjem biomase u nizu od osam fermentacija u kombinaciji s produljenom izlaganju stanica visokim koncentracijama etanola postignuti su selektivniji uvjeti koji omogućuju da upravo sojevi s poboljšanom brzinom fermentacije postanu brojčano dominantniji.

Ukupan broj živih stanica u podlozi rastao je tijekom prve četiri fermentacije i to za obje kulture tretirane mutagenom kao i za kontrolu (slika 6). Najveći porast broja živih stanica tijekom prve tri fermentacije u kulturi 1, zatim 2, a najmanju u kontroli. Nakon 4. fermentacije broj stanica u podlozi opada, ali najizraženiji pad broja stanica zapažen je nakon 5. fermentacije. Opadanje broja stanica vjerojatno je posljedica je bržeg odumiranja slabije adaptiranih što je u skladu s rezultatima Blicek i sur. (2007).

Usporedbom slika 6 i 7 može se zaključiti da ne postoji povezanost između broja živih stanica u podlozi i omjera smanjenja mase kultura 1 i kulture 2 s masom smanjenja kontrole (omjer za kontrolu iznosi uvijek 1). Unatoč bitno manjem broju stanica u podlozi u kulturi 1 i

2, omjera smanjenja mase kulture 1 i 2 bitno se ne razlikuje od kontrole tijekom prve tri fermentacije (slika 9). Izraženiji porast omjera smanjenja mase za kulturu 2 zapažen je nakon 4., 5. i 8. fermentacije. Nakon osme fermentacije vrijednost smanjenja omjera mase za kultura 1 i 2 u odnosu na kontrolu je dvostruko veća što je vjerovatno posljedica dominacije mutanata koji brže previru sladovinu.

Nacijepeljivanjem na selektivne podloge izolirana su pedeset i dva mutanta koji brže rastu u sladovini s 25 % ekstrakta i u prisustvu visokih koncentracija etanola. Uspoređene su brzine fermentacije ovih mutanata u tekućoj sladovini, te je izdvojeno osam mutanata s boljim fermentacijskim karakteristikama (sojevi 7-2, 12-2, 18-1, 18-2, 22-1, 39-2, 43-1 i 43-2).

Biomasa kvasca u proizvodnji piva se reciklira više puta, pa smo provjerili kako reciklacija biomase utječe na brzinu fermentacije izoliranih sojeva. Provedene su dvije fermentacije u nizu. Tijekom prvih 24 sata u 1. fermentaciji brzina smanjenja mase kulture mutanata i divljeg tipa (soj WT) nije se značajnije razlikovala. Međutim nakon prvog dana brzina fermentacije se kod svih sojeva značajno smanjuje. Najmanja brzina fermentacije zabilježena je kod soja WT i soja 7-2. Najveću brzinu fermentacije i najveće smanjenje mase na kraju fermentacije postigao je soy 12-2. Smanjenje mase podloge na kraju fermentacije je za 12 % više nego kod soja WT. Tijekom druge fermentacije brzina smanjenja mase podloge kod svih mutanata je viša nego kod soja WT. Smanjenje mase podloge na kraju fermentacije je od 9-13 % viša nego kod soja WT. Rezultati pokazuju da se recikliranjem biomase ne mijenjaju fermentacijska svojstva izoliranih sojeva.

5.2. Kinetika fermentacije sladovine sa sojem 12-2 i WT

Izolirani soy 12-2 u prethodnim eksperimentima pokazao je najveću brzinu fermentacije, te najveću prevrelost podloge na kraju uzgoja. Provedena je fermentacija sladovine s 25 % u bioreaktoru sa sojem 12-2 i divljim tipom (WT). Od fermentabilnih šećera sladovina sadrži 63% maltoze, 18% maltotrioze, 14 % glukoze i 4 % fruktoze.

Krivulje rasta broja živih stanica po mililitru podloge tijekom uzgoja (slika 10) za soy 12-2 i WT pokazuju bitno različit način rasta. Nakon nacijepeljivanja soy 12-2 raste eksponencijalno do 96. sata kada ulazi u stacionarnu fazu. Naprotiv broj stanica soja WT ne mijenja se prva 24 sata uzgoja (lag fazi rasta). Do 72 sata stanice se nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, a potom ulaze u stacionarnu fazu. Nakon 96. sata stanice ubrzano odumiru. Naprotiv ovisnost koncentracije suhe tvari tijekom uzgoja (slika 11) pokazuje vrlo sličnu tendenciju rasta. Tijekom prva 24 sata zabilježen je manji pad koncentracije suhe tvari što može biti posljedica

trošenjem rezervnog šećera trehaloze (slika 14). Nakon ulaska stanica u stacionarnu fazu rasta koncentracija suhe tvari raste što je posljedica rasta mase stanica.

Soj 12-2 i WT troše istim redosljedom fermentabilne šećere u sladovini (slika 12). Prvo troše glukozu, a s pomakom od 24 započinje potrošnja fruktoze. Brzina potrošnje ovih šećera vrlo je slična kod oba soja. Maltozu i maltotriozu stanice počinju trošiti nakon što je koncentracija glukoze pala ispod 20 g/L. Međutim stanice soja 12-2 troše maltozu brže za 30% i maltotriozu za 14 % u odnosu na soj WT. Sadržaj fermentabilnih šećera na kraju uzgoja sa sojem 12-2 je za 10 % niži nego u kulturi soja WT.

Koeficijent konverzije fermentabilnih šećera u biomasu ($Y_{X/S}$) za oba soja iznosi 0,025 g/g. Unatoč većem stupnju prevrenja fermentabilnih šećera kod soja 12-2 prinos biomase je isti kao i kod soja WT. Najvjerojatniji razlog je limitacija rasta sterolima i nezasićenim masnim kiselinama čija koncentracija ovisi o koncentraciji otopljenog kiska na početku uzgoja.

Oba soja započinju sintezu etanola nakon inokulacije podloge. Brzina sinteze etanola tijekom prvih 72 sata uzgoja je za 13 % veća nego kod WT soja. Nadalje volumni udjel etanola na kraju fermentacije za 0,9 % veći nego kod soja WT. Devetog dana uzgoja kada fermentacija završava (nema promjene u koncentraciji maltoze i maltotrioze) volumni udjel etanola doseže vrijednost od 10,1 % za soj 12-2 i 9,4 % za soj WT. Zaostao visok sadržaj šećera vjerovatno je posljedica limitacije rasta sterolima i nezasićenim masnim kiselinama čija je sinteza ovisna o koncentraciji otopljenog kisika na početku uzgoja. Zato je potrebno u daljnjim istraživanjima provjeriti utjecaj povećane povećati početnu koncentraciju otopljenog kisika. Bolje fermentacijske karakteristike soja 12-2 vjerovatno su posljedica bolje adaptacije soja na visoke koncentracije šećera i visoke koncentracije etanola.

Udjel trehaloze i glikogena važan je pokazatelj fiziološkog stanja matičnog kvasca u pivarstvu (Smart, 2008). Glikogen je rezervni ugljikohidrat koji se troši za sintezu lipida u stanici i za endogeni metabolizam tijekom čuvanja (Boulton i Quain, 2008; Gibson i sur., 2008). Osim što je rezervni ugljikohidrat trehaloza ima važnu ulogu u zaštiti stanica od stresa (npr. osmotski tlak i visoka koncentracija etanola). Udjel trehaloze i glikogena vrlo je sličan kod oba soja, ali ipak nešto viši kod divljeg tipa. Prva 24 sata dolazi do trošenja trehaloze u stanici što ima za posljedicu gubitak suhe tvari biomase. Nakon 24. sata uzgoja započinje sinteza trehaloze i glikogena, i završava s ulaskom stanice u stacionarnu fazu. Tijekom stacionarne faze rasta dolazi do polaganog trošenja oba rezervna polisaharida. Koncentracije glikogena značajno su niže nego u proizvodnji piva što se može biti posljedica različitih uvjeta uzgoja: niža koncentracija otopljenog kisika, mehaničko miješanje podloge, različita geometrija bioreaktora, viša temperatura fermentacije i slično (Blieck i sur., 2007;).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi ovog istraživanja može se zaključiti:

1. Primjenom evolucijskog inženjerstva selekcionirano je osam sojeva kvasca koji brže fermentiraju sladovinu s vrlo visokim udjelom ekstrakta od soja WT.
2. Jednokratnim recikliranjem biomase selekcioniranih sojeva kvasca ne dolazi do smanjenja brzine fermentacije, te se postiže od 9-13 % viši stupanj prevrenja u odnosu na soj WT.
3. Brzina previranja fermentabilnih šećera sa sojem 12-2 je za 12 % veća nego za divlji tip (WT). Povećanje brzine potrošnje šećera posljedica je brže potrošnje maltoze (30 %) i maltotrioze (14%) u odnosu dana divlji soj.
4. Brzina sinteze etanola sa sojem 12-2 je za 13 % veća nego kod WT soja. Volumni udjel etanola na kraju fermentacije iznosi 10,1 % što je za 0,9 % veće nego kod soja WT.

7. LITERATURA

- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J. M., & Prior, B. A. (1994). GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Bio.*, 14(6), 4135-4144.
- Anonymous 1 <http://viriditasveritas.blogspot.com/2011/09/new-yeast-and-new-hope.html> pristupnjeno 30.03.2013.
- Argüelles, J. C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.*, 174(4), 217-224.
- Bamforth, C. (2009). *Beer: tap into the art and science of brewing*. Oxford University Press, USA.
- Bamforth, C. W. (2003). Barley and malt starch in brewing: A general review. *MBAA Tech. Quart*, 40(2), 89-97.
- Bamforth, C. W. (2006). *Scientific principles of malting and brewing*. St. Paul: American Society of Brewing Chemists.
- Blicek, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M., & Van Dijck, P. (2007). Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(3), 815-824
- Boulton, C. M., & Quain, D. (2008). *Brewing yeast and fermentation*. Wiley-Blackwell.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., & Brookes, P. A. (2004). *Brewing: science and practice*. CRC Press LLC.
- Cahill, G., Walsh, P. K., & Donnelly, D. (2000). Determination of yeast glycogen content by individual cell spectroscopy using image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 69(3), 312-322.
- D'Amore, T., Crumplen, R., & Stewart, G. G. (1991). The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *J. Ind. Microbiol.*, 7(3), 191-195.
- D'Amore, T., Russell, I., & Stewart, G. G. (1989). Sugar utilization by yeast during fermentation. *J. Ind. Microbiol*, 4(4), 315-323.
- Day, R. E., Rogers, P. J., Dawes, I. W., & Higgins, V. J. (2002). Molecular analysis of maltotriose transport and utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(11), 5326-5335.

- Dietvorst, J., Walsh, M. C., Van Heusden, G. P. H., & Steensma, H. Y. (2010). Comparison of the MTT1-and MAL31-like maltose transporter genes in lager yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 310(2), 152-157.
- Gibson, B. R., Boulton, C. A., Box, W. G., Graham, N. S., Lawrence, S. J., Linforth, R. S., & Smart, K. A. (2008). Carbohydrate utilization and the lager yeast transcriptome during brewery fermentation. *Yeast*, 25(8), 549-562.
- Guldfeldt, L. U., & Arnfborg, N. (1998). The effect of yeast trehalose content at pitching on fermentation performance during brewing fermentations. *J. Inst. Brew.*, 104(1), 37-39.
- Heggart, H. M., Margaritis, A., Pilkington, H., Stewart, R.J., Dowhanick, T.M., Russell I. (1999). Factors affecting yeast viability and vitality characteristics, a review. *MBAA Tech. Quart.*, 36, 383-406.
- Hohmann, S., & Zimmermann, F. K. (1986). Cloning and expression on a multicopy vector of five invertase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Gent.*, 11(3), 217-225.
- Hounsa, C. G., Brandt, E. V., Thevelein, J., Hohmann, S., & Prior, B. A. (1998). Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, 144(3), 671-680.
- Huuskonen, A., Markkula, T., Vidgren, V., Lima, L., Mulder, L., Geurts, W., ... & Londesborough, J. (2010). Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(5), 1563-1573.
- Ishtar Snoek, I. S., & Yde Steensma, H. (2007). Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 24(1), 1-10.
- Jakobsen, M. and Piper, J.U. (1989) Performance and osmotolerance of different strains of lager yeast in high gravity fermentations. *MBAA Tech. Quart*, 26 (2), 56-61.
- Lei, H., Zhao, H., Yu, Z., & Zhao, M. (2012). Effects of Wort Gravity and Nitrogen Level on Fermentation Performance of Brewer's Yeast and the Formation of Flavor Volatiles. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 166(6), 1562-1574.
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., ... & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, 108(35), 14539-14544.

- Lucero, P., Penalver, E., Moreno, E., Lagunas, R. (2000). Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. microbiol.*, 66(10), 4456-4461.
- Meneses, F. J., Henschke, P. A., & Jiranek, V. (2002). A survey of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals numerous altered patterns of maltose and sucrose utilisation. *J. Inst. Brew.*, 108(3), 310-321.
- Montrocher, R., Verner, M. C., Briolay, J., Gautier, C., & Marmeisse, R. (1998). Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int.J. Syst. Bacteriol.*, 48(1), 295-303.
- Munroe, J. H. (2006). *Aging and Finishing*. Food Science and technology, New York –Marcel Dekker, 157, 525.
- Nevoigt, E. (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.*, 72(3), 379-412.
- Pidocke, M. P., Kreis, S., Heldt-Hansen, H. P., Nielsen, K. F., Olsson, L. (2009). Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84(3), 453-464.
- Parrou, J. L., & François, J. (1997). A Simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cell. *Anal. biochem.*, 248(1), 186-188.
- Priest FG, Stewart GG. (2006). *Handbook of Brewing*. CRC Press. p. 84.
- Saerens, S. M. G., Verbelen, P. J., Vanbeneden, N., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80(6), 1039-1051.
- Saerens, S. M., Duong, C. T., & Nevoigt, E. (2010). Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86(5), 1195-1212.
- Sauer, U. (2001). Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. In *Metabolic Engineering* (pp. 129-169). Springer Berlin Heidelberg.
- Sherman, F., G. R. Fink, and J. Hicks. 1982. Isolation and characterization of auxotrophic, temperature sensitive- and UC-sensitive mutants, p. 4-8. In F. Sherman,

G. R. Fink, and J. Hicks (ed.), *Methods in yeast genetics: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- Shima, J., Takagi, H. (2009). Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 53(3), 155-164.
- Sigler, K., Matoulková, D., Dienstbier, M., & Gabriel, P. (2009). Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor, and haze. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 82(6), 1027-1035.
- Smart, K. (Ed.). (2008). *Brewing yeast fermentation performance*. Wiley-Blackwell.
- Smart, K. A. (2007). Brewing yeast genomes and genome-wide expression and proteome profiling during fermentation. *Yeast*, 24(11), 993-1013.
- Stewart, G. G., Bothwick, R., Bryce, J., Cooper, D., Cunningham, S., Hart, C., Hammond, R. (1997). Recent developments in high gravity brewing. Questions and answers. *MBAA Tech. Quart.*, 34(1), 264-270.
- Stewart, G.G. (2004). The chemistry of beer instability. *Journal of chemical education*, 81,: 963.
- Verbelen, P. J., Dekoninck, T. M. L., Saerens, S. M. G., Van Mulders, S. E., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2009). Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 82(1), 155-167.
- Verbelen, P. J., Dekoninck, T. M. L., Saerens, S. M. G., Van Mulders, S. E., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2009). Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 82(1), 155-167.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J.Biosci. Bioeng.*, 96(2), 110-118.
- Weusthuis, R. A., Adams, H., Scheffers, W. A., & Van Dijken, J. P. (1993). Energetics and kinetics of maltose transport in *Saccharomyces cerevisiae*: a continuous culture study. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(9), 3102-3109

