

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Janez KOSEL

**VPLIV MEŠANE FERMENTACIJE KVASOVK  
*Saccharomyces cerevisiae* IN *Dekkera bruxellensis* NA  
BIOSINTEZO AROMATSKIH SNOVI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Janez KOSEL

**VPLIV MEŠANE FERMENTACIJE KVASOVK *Saccharomyces cerevisiae* IN *Dekkera bruxellensis* NA BIOSINTEZO AROMATSKIH SNOVI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE INFLUENCE OF MIXED FERMENTATIONS OF YEASTS  
*Saccharomyces cerevisiae* AND *Dekkera bruxellensis* ON THE  
BIOSYNTHESIS OF AROMATIC COMPOUNDS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2014

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 9. 10. 2009 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biotehnologija. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Peter Raspov.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani in na Oddelku za Biologijo na Univerzi v Minhu na Portugalskem ob finančni podpori Ministrstva za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo Republike Slovenije (št. 1000-09-310217).

Mentor: prof. dr. Peter RASPOR

## Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Peter RASPOR  
Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o zdravju, Inštitut za hrano, prehranjevanje in zdravje

Članica: prof. dr. Ana PLEMENITAŠ  
Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Doktorand:  
Janez KOSEL

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 604.4:582.282.23:579.26:663.252.4(043)=163.6
KG	kvasovke/vinske kvasovke/ <i>Saccharomyces cerevisiae/Dekkera bruxellensis/</i> alkoholna fermentacija vina/mikrobne interakcije/aromatske spojine/biosinteza /hlapni fenoli/hidroksicimetove kisline/DNA mikromreže/membranski bioreaktor/PCR v realnem času
AV	KOSEL, Janez, univ. dipl. biotehnol.
SA	RASPOR, Peter (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje: biotehnologija
LI	2014
IN	VPLIV MEŠANE FERMENTACIJE KVASOVK <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IN <i>Dekkera bruxellensis</i> NA BIOSINTEZO AROMATSKIH SNOVI
TD	Doktorska disertacija
OP	XIII, 117 str., 33 pregl., 19 sl., 25 pril., 178 vir.
IJ	Sl
JI	Sl/en
AI	V tem delu smo razvili membranski bioreaktor za sistematično preučevanje mikrobnih interakcij med kvasovkama <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>Dekkera bruxellensis</i> in njun vpliv na vinsko aroma. V mešanih fermentacijah je prišlo do zmanjšanja koncentracije etilfenolov. Za proizvodnjo etilfenolov, je <i>D. bruxellensis</i> , v primerjavi z vinilfenoli, preferenčno privzemala in asimilirala hidroksicimetove kisline, ki jih je v gojišče akumulirala kvasovka <i>S. cerevisiae</i> . Prisotnost kvasovke <i>D. bruxellensis</i> je povzročila statistično značilno povečanje izražanja 77 transkriptov znotraj kvasovke <i>S. cerevisiae</i> . To so bili večinoma transkripti z nepoznano funkcijo ali pa so bili vpleteni v odziv na stres, ki je bil spodbujen z anaerobiozo. Poleg tega se je povečalo izražanje tudi genov za membranske permeaze, ki prenašajo žveplo-vsebujoče aminokisline in tiamin biosinteznih genov. V membransko ločenih fermentacijah smo opazili povečanje v izražanju številnih PAU genov, ki so povezani z anaerobiozo. To kaže na prisotnost tekmovanja za prevzem kisika med kvasovkama <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. bruxellensis</i> . Izrazitejše reduksijske razmere, ki so nastale kot posledica tekmovanja, bi bile lahko razlog za povečanje koncentracije etilnih estrov in maščobnih kislin v membransko ločenih fermentacijah. Dodatno smo ugotovili, da manjša razpoložljivost aminokislín, do katere je prišlo zaradi tekmovanja kvasovk v membransko ločenih fermentacijah, negativno vpliva na produkcijo višjih alkoholov. Nadalje smo preučili vpliv etanola in hidroksicimetovih in vinilfenolnih prekurzorjev na biosintezo hlapnih fenolov. Vinilfenolni prekurzorji so v primerjavi s hidroksicimetovimi kislinami močno zavrl rast kvasovke <i>S. cerevisiae</i> in proizvodnjo etilfenolov. Kljub vsemu pa je bilo ugotovljeno, da sta gena <i>KKD</i> in <i>VPR</i> kvasovke <i>D. bruxellensis</i> , ki kodirata zapis za encim kumarat-dekarboksilazo in vinilfenol-reduktazo, bolj odzivna na vinilfenolne prekurzorje v primerjavi s hidroksicimetovimi kislinami. Posledično je bilo ugotovljeno, da so večje koncentracije vinilfenolov v celici bolj citotoksične v primerjavi s hidroksicimetovimi kislinami. Na splošno so nizke koncentracije etanola povzročile povečanje v proizvodnji hlapnih fenolov v kvasovkah <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. bruxellensis</i> . To opažanje se je odrazilo tudi v vzorcu ekspresije gena <i>KKD</i> kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	UDC 604.4:582.282.23:579.26:663.252.4(043)=163.6
CX	yeasts/wine yeasts/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / <i>Dekkera bruxellensis</i> /alcoholic fermentation of wine/microbial interactions/aromatic compounds/biosynthesis /volatile phenols/hidroxcinnamic acids/DNA microarrays/membrane bioreactor/real time PCR
AU	KOSEL, Janez
AA	RASPOR, Peter (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field: Biotechnology
PY	2014
TI	THE INFLUENCE OF MIXED FERMENTATIONS OF YEASTS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AND <i>Dekkera bruxellensis</i> ON THE BIOSYNTHESIS OF AROMATIC COMPOUNDS
DT	Doctoral Dissertation
NO	XIII, 117 p., 33 tab., 19 fig., 25 ann., 178 ref.
LA	Sl
AL	SL/en
AB	A double compartment membrane system was constructed in order to systematically study microbial interactions between yeasts <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Dekkera bruxellensis</i> and their impact on wine aroma. In mixed cultures the concentration of ethylphenols was also reduced. For ethylphenol production, <i>D. bruxellensis</i> preferably assimilated hydroxycinnamic acids to vinylphenols that were accumulated by <i>S. cerevisiae</i> . The presence of <i>B. bruxellensis</i> induced 77 transcripts of <i>S. cerevisiae</i> . These were mostly of unknown function or were involved in the anaerobiosis induced stress response. Sulphur amino acid permease and thiamine biosynthetic genes were also induced suggesting competitive relationships between the two species. In mixed fermentations an up-regulation of a large number of <i>PAU</i> genes associated with anaerobiosis was observed. This indicates for a competition for oxygen between <i>S. cerevisiae</i> and <i>D. bruxellensis</i> . Greater reductive conditions could explain the increase in the accumulation of ethyl esters and fatty acids in mixed cultures. Also, lower availability of amino acids due to the competition for nutrients could hinder the production of higher alcohols. In the continuation, we examined the impact of ethanol and hidroxcinnamic and vinylphenol precursors on the production of volatile phenols. In comparison to hydroxycinnamic acids, vinylphenol precursors significantly inhibited the growth of <i>S. cerevisiae</i> and the production of ethylphenols. Nevertheless, it was found that <i>D. bruxellensis</i> genes <i>KKD</i> and <i>VPR</i> , encoding for enzymes coumaric acid decarboxylase and vinylphenol reductase, are more responsive to vinylphenol precursors in comparison to hydroxycinnamic acids. Consequently, higher concentrations of vinylphenols in the cell were found to be more cytotoxic than hydroxycinnamic acids. In general, low ethanol concentrations induced higher production of volatile phenols by <i>S. cerevisiae</i> and <i>D. bruxellensis</i> . This was confirmed by the expression pattern of gene <i>KKD</i> of <i>D. bruxellensis</i> .

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>iii</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>iv</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>v</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>viii</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>ix</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>x</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>xi</b>
<b>SLOVARČEK .....</b>	<b>xiii</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 VPLIV VINSKIH MIKROORGANIZMOV NA FERMENTACIJO VINA.....	3
2.2 SINTEZA AROMATSKIH SNOVI S KVASOVKO <i>S. cerevisiae</i> .....	3
2.2.1 Sinteza višjih alkoholov .....	4
2.2.2 Sinteza aromatskih estrov .....	4
2.2.3 Sinteza hlapnih žveplovih spojin.....	4
2.3 KONTAMINACIJA S KVASOVKO <i>D. bruxellensis</i> .....	5
2.3.1 Hlapni fenoli in kvar vina.....	5
2.3.2 Pozitivni in negativni učinki hlapnih fenolov .....	6
2.3.3 Prilagodljivost kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	7
2.4 SINTEZA HLAPNIH FENOLOV .....	8
2.4.1 Dekarboksilaze za fenilakrilične kisline v vinskih mikroorganizmih.....	9
2.4.2 Dekarboksilaze za fenolne kisline kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .....	10
2.4.2.1 Transformacija bakterijskih dekarboksilaz v kvasovko <i>S. cerevisiae</i> z namenom izboljšanja arome vina.....	11
2.4.3 Dekarboksilaze za fenolne kisline v kvasovkah <i>Dekkera</i> spp. ....	11
2.4.4 Vinilfenol-reduktaze v vinskih mikroorganizmih .....	12
2.4.5 Encim z vinilfenol-reduktazno aktivnostjo kvasovke <i>Dekkera bruxellensis</i> .....	12
2.5 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA RAST KVASOVKE <i>D. bruxellensis</i> IN NA PRODUKCIJO HLAPNIH FENOLOV V VINU .....	13
2.5.1 Vpliv prekurzorskih molekul iz grozdnih jagod .....	13
2.5.1.1 Izvor hidroksicimetovih kislin .....	13
2.5.1.2 Vpliv hidroksicimetovih kislin na zaviranje rasti kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	14
2.5.2 Vpliv koncentracije etanola.....	15
2.5.2.1 Vpliv etanola na rast kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	15
2.5.2.2 Vpliv etanola na biosintezo hlapnih fenolov kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	16
2.5.2.3 Vpliv etanola na porabo sladkorjev kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	16
2.5.2.4 Vpliv etanola na prevzem prekurzorjev .....	16
2.5.3 Vpliv raznolikosti sevov kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	17
2.5.3.1 Vpliv raznolikosti sevov na rast kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	17
2.5.3.2 Vpliv vrst in raznolikosti sevov na prevzem hidroksicimetovih kislin .....	17
2.5.3.3 Vpliv raznolikosti sevov na biosintezo hlapnih fenolov .....	18
2.5.4 Producija hlapnih fenolov s kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
2.6 MIKROBNE INTERAKCIJE V MEŠANIH FERMENTACIJAH .....	19
2.6.1 Mešane fermentacije med <i>S. cerevisiae</i> in ne- <i>Saccharomyces</i> kvasovkami.....	19
2.6.2 Vpliv mikrobnih interakcij med kvasovkama <i>D. bruxellensis</i> in <i>S. cerevisiae</i> ....	21
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>23</b>
3.1 MATERIALI .....	23

<b>3.1.1 Kulture kvasovk <i>D. bruxellensis</i> in <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2 Bioreaktorji.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.3 Membranski bioreaktor.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.4 Mikrobiološka gojišča.....</b>	<b>24</b>
3.1.4.1 Standardna gojišča .....	24
3.1.4.2 Diferencialno gojišče .....	25
3.1.4.3 Umetni mošt .....	26
<b>3.1.5 Reagenti in raztopine .....</b>	<b>29</b>
3.1.5.1 Reagenti za izolacijo DNA.....	29
3.1.5.2 Reagenti za izolacijo RNA.....	29
3.1.5.3 Reagenti in raztopine za preverjanje RNA na gelu .....	30
<b>3.1.6 Začetni oligonukleotidi .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.7 Reagenti za obratni prepis celokupne molekule RNA v molekulo cDNA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.8 Reagenti za pripravo reakcijske mešanice PCR v realnem času .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.9 Mikromreže .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.10 Oprema za prepis v cDNA, cRNA in za hibridizacijo na DNA mikromreže....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.11 Kemikalije za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.....</b>	<b>34</b>
3.1.11.1 Mobilna faza za določanje hlapnih fenolov .....	34
3.1.11.2 Mobilna faza za določanje sladkorjev in alkoholov.....	34
3.1.11.3 Standardne raztopine za pripravo umeritvene krivulje.....	34
3.1.11.3.1 Umeritvena krivulja za glukozo in fruktozo .....	34
3.1.11.3.2 Umeritvena krivulja za etanol .....	35
3.1.11.3.3 Umeritvena krivulja za glicerol .....	35
3.1.11.3.4 Umeritvena krivulja za 4-etylfenol .....	36
3.1.11.3.5 Umeritvena krivulja za 4-etylgvajakol .....	36
3.1.11.3.6 Umeritvena krivulja za 4-vinilfenol.....	36
3.1.11.3.7 Umeritvena krivulja za 4-vinilgvajakol .....	37
<b>3.1.12 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS).....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.13 Pufri.....</b>	<b>37</b>
3.1.13.1 Fosfatni puffer .....	37
<b>3.1.14 Merilne aparature, laboratorijski pribor in oprema .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 METODE .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2.1 Vpliv kvasovke <i>D. bruxellensis</i> na metabolizem kvasovke <i>S. cerevisiae</i> in na končno aroma vina v membransko ločenih kulturah .....</b>	<b>42</b>
3.2.1.1 Fermentacije v membranskem bioreaktorju .....	42
3.2.1.2 Namnoževanje biomase za pripravo inokuluma .....	43
3.2.1.3 Fermentacije v erlenmajericah .....	43
3.2.1.4 Določanje koncentracije celic pod mikroskopom .....	43
3.2.1.5 Štetje kolonij na ploščah .....	44
3.2.1.6 Merjenje gostote umetnega mošta.....	45
3.2.1.7 Ekstrakcija estrov, hlapnih kislin in višjih alkoholov in določanje njihove koncentracije .....	47
3.2.1.8 Merjenje koncentracije etanola, glicerola, glukoze in fruktoze .....	48
3.2.1.9 Merjenje koncentracije hlapnih fenolov.....	48
3.2.1.10 Izolacija celokupne RNA .....	48
3.2.1.11 Transkriptomska analiza izražanja genoma kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .....	49
<b>3.2.2 Vpliv prekurzorskih molekul, etanola, in različnih sevov kvasovke <i>D. bruxellensis</i> na proizvodnjo hlapnih fenolov v mešanih fermentacijah s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>57</b>
3.2.2.1 Vpliv prekurzorskih molekul v fermentacijah z mešanimi in čistimi kulturami ....	57
3.2.2.2 Vpliv etanola v fermentacijah z mešanimi in čistimi kulturami.....	58

3.2.2.3	Vpliv raznolikosti sevov kvasovke <i>D. bruxellensis</i> v fermentacijah z mešanimi in čistimi kulturami .....	58
3.2.2.4	Ali je kvasovka <i>D. bruxellensis</i> sposobna privzemati glicerol?.....	59
3.2.2.5	Merjenje izražanja genov z analizo PCR-RČ .....	59
3.2.2.5.1	Merjenje koncentracije celokupne RNA.....	59
3.2.2.5.2	Preverjanje kvalitete in čistosti RNA z agarozno gelsko elektroforezo.....	59
3.2.2.5.3	Obratni prepis RNA molekule v molekulo cDNA.....	60
3.2.2.5.4	Konstrukcija začetnih oligonukleotidov .....	60
3.2.2.5.5	Relativne standardne krivulje za tarčne in hišne gene kvasovk <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. bruxellensis</i> .....	61
3.2.2.5.6	Priprava reakcijskih mešanic za analizo PCR-RČ .....	61
3.2.2.5.7	Analiza rezultatov pridobljenih z metodo PCR-RČ.....	62
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>64</b>
4.1	VPLIV KVASOVKE <i>D. bruxellensis</i> NA METABOLIZEM KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i> IN NA KONČNO AROMO VINA V MEMBRANSKO LOČENIH KULTURAHH .....	64
4.1.1	<b>Preskušanje membranskega bioreaktorja .....</b>	<b>64</b>
4.1.1.1	Rast kvasovk in fermentacijska kinetika v membranskih bioreaktorjih in erlenmajericah .....	65
4.1.1.2	Producija hlapnih fenolov v membranskih bioreaktorjih in erlenmajericah .....	71
4.1.2	<b>Transkriptomskna analiza.....</b>	<b>72</b>
4.1.3	<b>Analiza aromatskih snovi .....</b>	<b>76</b>
4.2	VPLIV PREKURZORSKIH MOLEKUL, ETANOLA IN RAZLIČNIH SEVOV KVASOVKE <i>D. bruxellensis</i> NA PROIZVODNJO HLAPNIH FENOLOV V MEŠANIH FERMENTACIJAH S KVASOVKO <i>S. cerevisiae</i> .....	79
4.2.1	<b>Vpliv prekurzorskih molekul v mešanih fermentacijah .....</b>	<b>79</b>
4.2.2	<b>Vpliv etanola v mešanih fermentacijah .....</b>	<b>82</b>
4.2.3	<b>Vpliv uporabe različnih sevov kvasovke <i>D. bruxellensis</i> v mešanih fermentacijah.....</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>94</b>
5.1	VPLIV KVASOVKE <i>D. bruxellensis</i> NA METABOLIZEM KVASOVKE <i>S. cerevisiae</i> IN NA KONČNO AROMO VINA V MEMBRANSKO LOČENIH KULTURAHH .....	94
5.1.1	<b>Rast kvasovk in fermentacijska kinetika v fermentacijah z mešano, membransko ločeno ali čisto kulturo.....</b>	<b>94</b>
5.1.2	<b>Producija hlapnih fenolov v fermentacijah z mešano, membransko ločeno ali čisto kulturo .....</b>	<b>95</b>
5.1.3	<b>Transkriptomskna analiza.....</b>	<b>96</b>
5.1.4	<b>Analiza aromatskih snovi .....</b>	<b>97</b>
5.2	VPLIV PREKURZORSKIH MOLEKUL, ETANOLA IN RAZLIČNIH SEVOV KVASOVKE <i>D. bruxellensis</i> NA BIOSINTEZO IN AKUMULACIJO HLAPNIH FENOLOV V MEŠANIH FERMENTACIJAH S KVASOVKO <i>S. cerevisiae</i> .....	99
5.2.1	<b>Vpliv prekurzorskih molekul v mešanih fermentacijah .....</b>	<b>99</b>
5.2.2	<b>Vpliv etanola v mešanih fermentacijah .....</b>	<b>100</b>
5.2.3	<b>Vpliv različnih sevov kvasovke <i>D. bruxellensis</i> v mešanih fermentacijah s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>100</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY).....</b>	<b>104</b>
7.1	POVZETEK .....	104
7.2	SUMMARY .....	105
<b>8</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>106</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Zaznavni prag za hlapne fenole in njihove koncentracije v rdečem vinu (Curtin in sod., 2005).....	7
Preglednica 2: Izvor sevov kvasovk <i>D. bruxellensis</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	23
Preglednica 3: Tekoče gojišče YPD za pripravo starter kultur (Raspor in Smole Možina, 1993)....	25
Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča YPD (Atlas, 2004). ....	25
Preglednica 5: Diferencialno gojišče za štetje kolonij kvasovk <i>D. bruxellensis</i> na ploščah tekom večvrstne fermentacije skupaj s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> (Ueno in sod., 2001). .....	26
Preglednica 6: Makroelementi v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990).....	26
Preglednica 7: Mikroelementi v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990). .....	27
Preglednica 8: Vitamini v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990).....	27
Preglednica 9: Aminokisline v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990).....	28
Preglednica 10: Koncentracija ergosterola v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990). .....	28
Preglednica 11: Volumni prenosa založnih raztopin za pripravo 1L mošta MS300 (Bely in sod., 1990). .....	29
Preglednica 12: Priprava 50x TAE pufra .....	30
Preglednica 13: Začetni oligonukleotidi kvasovke <i>S. cerevisiae</i> za hišne gene, uporabljeni pri metodi PCR-RČ.....	30
Preglednica 14: Začetni oligonukleotidi kvasovke <i>D. bruxellensis</i> za hišne gene, uporabljeni pri metodi PCR-RČ.....	31
Preglednica 15: Začetni oligonukleotidi kvasovke <i>S. cerevisiae</i> za tarčne gene, uporabljeni pri metodi PCR-RČ.....	31
Preglednica 16: Začetni oligonukleotidi kvasovke <i>D. bruxellensis</i> za tarčne gene, uporabljeni pri metodi PCR-RČ.....	31
Preglednica 17: Komplet SuperScript ® VILO cDNA synthesis za obratni prepis v molekulo cDNA. ....	31
Preglednica 18: Redčenje glukoze ali fruktoze za izdelavo umeritvene krivulje.....	35
Preglednica 19: Redčenje etanola za izdelavo umeritvene krivulje. ....	35
Preglednica 20: Redčenje glicerola za izdelavo umeritvene krivulje.....	35
Preglednica 21: Redčenje 4-etilfenola za izdelavo umeritvene krivulje. ....	36
Preglednica 22: Sestava fosfatnega pufra PBS.....	38
Preglednica 23: Laboratorijski pribor, ki smo ga potrebovali pri eksperimentalnem delu. ....	38
Preglednica 24: Merilne aparature in oprema, ki smo jih potrebovali pri eksperimentalnem delu... <td>39</td>	39
Preglednica 25: Serijske redčitve mešanice Spike-In in vnos mešanice v 200 ng vzorčne RNA. ....	50
Preglednica 26: Priprava mešanice cDNA. ....	51
Preglednica 27: Priprava transkripcijske mešanice .....	51
Preglednica 28: Priprava mešanice za fragmentacijo vzorčne cRNA. ....	53
Preglednica 29: Priprava mešanice za hibridizacijo vzorčne cRNA na stekelce, ki je opremljeno z osmimi DNA mikromrežami.....	53
Preglednica 30: Potek spiranja stekelc z DNA mikromrežami. ....	55
Preglednica 31: Nastavitev na čitalcu G2505B Microarray .....	56
Preglednica 32: Razporeditev pozitivno izraženih transkriptov kvasovke <i>S. cerevisiae</i> v 4 skupine	74
Preglednica 33: Povprečne vrednosti in standardni odkloni hlapnih estrov, maščobnih kislin (SCFA: kratko verižne in MCFA: srednje verižne maščobne kisline) in alkoholov, ki so se akumulirali v sintetičnem moštu po 187 urah čistih in membransko ločenih fermentacij s kvasovkama <i>S. cerevisiae</i> in <i>D. bruxellensis</i> .....	78

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shema encimske biotransformacije hidroksicimetovih kislin (HCK) v vinilfenole in etilfenole (Botelho in sod., 2011).....	9
Slika 2: Shema laboratorijskih metod za ugotavljanje vpliva kvasovke <i>D. bruxellensis</i> na metabolizem aromatskih snovi kvasovke <i>S. cerevisiae</i> in ugotavljanje vpliva prekurzorskih molekul, etanola in različnih sevov kvasovke <i>D. bruxellensis</i> na sintezo hlapnih fenolov v mešanih fermentacijah. ....	41
Slika 3: Shematski prikaz membranskega bioreaktorja sestavljenega iz dveh predelov.....	65
Slika 4: Absolutna sprememba gostote mošta ( $ \Delta\rho_{MS300} $ ) (A) in rastna krivulja (B) kvasovk <i>S. cerevisiae</i> (■, ▲) in <i>D. bruxellensis</i> (▲, △) v čistih fermentacijah (odprtji simboli) in v fermentacijah ločenih z membrano (polni simboli) .....	67
Slika 5: Fermentacijska kinetika fermentacij izvedenih v membranskih bioreaktorjih (polni simboli) in v 250 mL erlenmajericah (odprtji simboli) .....	68
Slika 6: Prevzem glicerola s kvasovko <i>D. bruxellensis</i> .....	69
Slika 7: Rastna krivulja kvasovk (polni simboli) in absolutna sprememba v gostoti mošta ( $ \Delta\rho_{MS300} $ ) (prazni simboli) po fermentacijah izvedenih v sintetičnem moštu MS300, ki je vseboval 100 mg/L hidroksicimetovih kislin (■, ▲), ali 100 mg/L vinilfenolov (▲, △).....	70
Slika 8: Kinetika produkcije hlapnih fenolov v membranskem bioreaktorju (polni simboli) in v 250 mL erlenmajericah (odprtji simboli) .....	72
Slika 9: Vzorec izražanja transkriptov kvasovke <i>S. cerevisiae</i> znotraj določene skupine. ....	76
Slika 10: Proizvodnja hlapnih fenolov v sintetičnem moštu MS300 dopolnjenem z bodisi 100 mg/L hidroksicimetovih kislin (polni simboli) ali 100 mg/L vinilfenolov (prazni simboli) .....	81
Slika 11: Relativna raven izraženosti genov <i>PAD1</i> , <i>FDC1</i> , <i>KKD</i> in <i>VPR</i> kvasovk <i>S. cerevisiae</i> (beli stolpci) in <i>D. bruxellensis</i> (sivi stolpci) po 50 urah fermentacije v umetnem moštu dopolnjenem s 100 mg/L HCK. ....	81
Slika 12: Vpliv etanola na rastno krivuljo kvasovk (polni simboli) in na absolutno spremembo v gostoti mošta ( $ \Delta\rho_{MS300} $ ) (prazni simboli).....	84
Slika 13: Vpliv etanola na proizvodnjo 4-vinilvajakola (polni simboli) in 4-etilvajakola (prazni simboli) v sintetičnem moštu MS300 dopolnjenem z 20 mg/L hidroksicimetovih kislin ...	85
Slika 14: Vpliv etanola na proizvodnjo 4-vinilfenola (polni simboli) in 4-etilfenola (prazni simboli) v sintetičnem moštu MS300 dopolnjenem z 20 mg/L hidroksicimetovih kislin .....	86
Slika 15: Relativna raven izraženosti genov <i>PAD1</i> , <i>FDC1</i> , <i>KKD</i> in <i>VPR</i> kvasovk <i>S. cerevisiae</i> (beli stolpci) in <i>D. bruxellensis</i> (sivi stolpci) po 50 urah fermentacije .....	87
Slika 16: Rast biomase med fermentacijo z 11 različnimi sevi kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	89
Slika 17: Absolutna sprememba v gostoti mošta ( $ \Delta\rho_{MS300} $ ) po fermentacijah izvedenih z 11 različnimi sevi kvasovke <i>D. bruxellensis</i> .....	90
Slika 18: Producija 4-vinilfenola (a in c) in 4-etilfenola (b in d) med fermentacijo z 11 različnimi sevi kvasovke <i>D. bruxellensis</i> v čistih ali mešanih fermentacijah s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> EC1118.....	92
Slika 19: Producija 4-vinilvajakola (a in c) in 4-etilvajakola (b in d) med fermentacijo z 11 različnimi sevi kvasovke <i>D. bruxellensis</i> v čistih ali mešanih fermentacijah s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> EC1118. ....	93

## KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije glukoze.
- Priloga A2: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije fruktoze.
- Priloga A3: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije etanola.
- Priloga A4: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije glicerola.
- Priloga A5: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 4-etilfenola.
- Priloga A6: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 4-etilgvajakola.
- Priloga A7: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 4-vinilfenola.
- Priloga A8: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 4-vinilgvajakola.
- Priloga B1: Kopiranje hlapnih estrov, višjih alkoholov, maščobnih kislin in organskih kislin po 22 urah fermentacije z umetnim moštom MS300, ki smo ga inokulirali z membransko ločeno ali čisto kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*.
- Priloga B2: Kopiranje hlapnih estrov, višjih alkoholov, maščobnih kislin in organskih kislin po 92 urah fermentacije z umetnim moštom MS300, ki smo ga inokulirali z membransko ločeno ali čisto kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*.
- Priloga B3: Kopiranje hlapnih estrov, višjih alkoholov, maščobnih kislin in organskih kislin po 144 urah fermentacije z umetnim moštom MS300, ki smo ga inokulirali z membransko ločeno ali čisto kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*.
- Priloga C1: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *PAD1* kvasovke *S. cerevisiae*.
- Priloga C2: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *TEF1* kvasovke *S. cerevisiae*.
- Priloga C3: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *ACT1* kvasovke *S. cerevisiae*.
- Priloga C4: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *FDC1* kvasovke *S. cerevisiae*.
- Priloga C5: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *18S rRNA* kvasovke *S. cerevisiae*.
- Priloga C6: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *TEF1* kvasovke *D. bruxellensis*.
- Priloga C7: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *18S rRNA* kvasovke *D. bruxellensis*.
- Priloga C8: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *VPR* kvasovke *D. bruxellensis*.
- Priloga C9: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *KKD* kvasovke *D. bruxellensis*.
- Priloga C10: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *ACT1* kvasovke *D. bruxellensis*.
- Priloga D: Razporeditev 77 pozitivno izraženih transkriptov kvasovke *S. cerevisiae* glede na njihovo stopnjo izraženosti v membransko ločeni fermentaciji s kvasovko *D. bruxellensis* proti čisti kulti kvasovke *S. cerevisiae*.
- Priloga E: Elektroforezna analiza celokupne molekule RNA na gelu mikrofluidne aparature Agilent 2100 Bioanalyzer.
- Priloga F: Agarozna gelska elektroforeza za analizo kvalitete celokupne molekule RNA.
- Priloga G: Fotografije fermentacij v membranskih bioreaktorjih sestavljenih iz dveh predelov.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFU	število živih kolonij na ploščah (ang. Colony Forming Units)
Ct	cikel meje določanja, kjer je signal fluorescence vzorca višji od signala fluorescence ozadja
<i>CTT1</i>	gen, ki kodira citosolno katalazo T
E	učinkovitost reakcije
EF	etilfenoli
FK	ferulna kislina
<i>FDC1</i>	gen, ki kodira dekarboksilazo 1 za ferulno kislino v kvasovki <i>S. cerevisiae</i>
FDR	pogostnosti lažnih odkritij (ang. False Discovery Rate)
GC-MS	plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo
<i>GMC2</i>	gen, ki kodira protein, ki je vpletен v mejotsko homologno rekombinacijo DNA
HCK	hidroksicimetova kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High-Performance Liquid Chromatography)
IME2	gen, ki kodira proteinsko kinazo tipa serin/treonin
<i>IZH</i>	genska družina, ki kodira membranske proteine, ki delujejo v procesu homeostaze cinkovih ionov
<i>KKD</i>	gen, ki kodira dekarboksilazo za kumarno kislino v kvasovki <i>D. bruxellensis</i>
<i>KCC4</i>	gen, ki kodira proteinsko kinazo, ki je vpletena v sprožitev cepitvenega vratu pri celični delitvi
MCFA	srednje verižne maščobne kisline
MS300	kemijsko definirani mošt
<i>MTR4</i>	gen, ki kodira RNA helikazo, ki je vpletena v procesiranje in razgradnjo jedrne RNA
<i>MUPI1</i>	gen, ki kodira visoko afinitetno permeazo za aminokislino metionin
ORF	odprt bralni okvir

<i>PAD1</i>	gen, ki kodira dekarboksilazo 1 za fenilakrilične kisline v kvasovki <i>S. cerevisiae</i>
<i>PAU</i>	genska družina <i>PAU</i> kvasovke <i>S. cerevisiae</i> vpletena v odziv na anaerobiozo
<i>p-KK</i>	kumarna kislina
PCR-RČ	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (ang. Real time polymerase chain reaction)
<i>PLB2</i>	gen, ki kodira fosfolipazo B, ki je vpletena v metabolizem lipidov
SCFA	kratko verižne maščobne kisline
<i>STR3</i>	gen, ki kodira peroksisomalno beta-liazo za sintezo homocisteina
<i>SPG4</i>	gen, ki kodira protein, ki je vpletен v vzdrževanje stacionarne faze rasti kvasovke
<i>SPR28</i>	gen, ki kodira mejotski septin, ki je vpleten v proces mejotske delitve celice
<i>THI</i>	genska družina <i>THI</i> kvasovke <i>S. cerevisiae</i> za sintezo vitamina tiamina
VF	vinilfenoli
<i>VPR</i>	gen, ki kodira reduktazo za vinilfenole v kvasovki <i>D. bruxellensis</i>
YPD	kvasni ekstrakt, pepton in glukoza (ang. Yeast Peptone Dextrose)
<i>YSR3</i>	gen, ki kodira membranski protein, ki je vpleten v metabolizem sfingolipidov
4-EF	4-etilfenol
4-EG	4-etilgvajakol
4-VF	4-vinilfenol
4-VG	4-vinilgvajakol

## SLOVARČEK

aromatski profil vina	vse aromatske snovi, ki nastajajo tekom aktivnosti vinskih mikroorganizmov ali tekom zorenja vina v sodih
čista fermentacija	umetni mošt inokuliran z le eno vrsto kvasovke v anaerobnih pogojih
DNA mikromreže	površina, na katero so kovalentno vezani kratki oligonukleotidi, ki so komplementarni vsem pozanim ORF
fermentacijska kinetika	poraba sladkorjev in proizvodnja alkoholov
membranski bioreaktor	bioreaktor sestavljen iz membrane in dveh ločenih predelov za inkubacijo dveh vrst kvasovk v membransko ločeni kulturi
mešana fermentacija	umetni mošt inokuliran z več različnimi vrstami kvasovk v anaerobnih pogojih

## 1 UVOD

Nove razvojne smernice predpisujejo, da morajo biti vina ekološko pridelana in prepovedujejo ali omejujejo uporabo sredstev za zaščito in konzerviranje vin. Opuščajo se tudi mehanične oblike nadzora, kot je na primer filtracija, saj te lahko vplivajo na zmanjšanje aromatičnih snovi, pigmentov in koloidov v vinu. Biološka pridelava in dolgotrajno skladiščenje posledično omogočata razmere, ki so ugodne za pojav počasi rastочih kvasovk, kot so npr. *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Zygosaccharomyces bailii* in nekaterih vrst mlečnokislinskih bakterij (Suárez in sod., 2007). Zgoraj našteti mikroorganizmi so prilagojeni na pogoje pomanjkanja hrani in so enako tolerantni do etanola kot kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasovka rodu *Dekkera/Brettanomyces* lahko etanol izrablja kot vir ogljika, raste tako med zorenjem kot tudi po stekleničenju in embaliraju vina, prisotna pa je na grozdnih jagodah, v vinskih kleteh, še pogosteje pa jo najdemo v sodih, črpalkah in na orodju, ki ga le s težavo steriliziramo (Suárez in sod., 2007). *Dekkera* sp. povzroča kvar vina, tvori sedimente, motnost vina in je odgovorna za pojav vonja po mišjem urinu, za pojav acetne kisline in najpomembnejše hlapnih fenolov. Hlapni fenoli oziroma vinil- in etil fenoli štejejo med najbolj neprijetne značilnosti te kvasovke. Vinilfenoli so v belem vinu odgovorni za nastanek "medicinskega" priokusa, v rdečem vinu pa etilfenoli povzročajo vonj po konjskem znoju (Harris in sod., 2008). Tetrahidropiridini so odgovorni za vonj po mišjem urinu, vendar se v vinu redkeje pojavljajo kot pa hlapni fenoli, acetna kislina pa večinoma ne nastaja v anaerobnih pogojih fermentacije, saj je njena produkcija močno odvisna od seva kvasovke *D. bruxellensis* in od prisotnosti kisika (Romano in sod., 2008).

Poleg prej omenjenih negativnih vplivov na senzoriko vina kvasovke rodu *Dekkera* spp. lahko doprinesejo k pozitivnim lastnostim, kot so na primer vonj po dimljenosti in karamelu in prispevajo k zaželenemu »Bordeaux« karakterju vina (Jolly in sod., 2006). Tudi prisotnost hlapnih fenolov v vinu je lahko dopustna in celo zaželena. Senzorični prag vzburjenja za 4-etilfenol (4-EF) je 0,23 mg/L, (Suárez in sod., 2007). Če koncentracije ne presežejo 0,68 mg/L, je komponenta zaželena in govorimo o pozitivnemu doprinosu k aromi vina.

Poznani kvarljivci vina, kot so na primer kvasovke iz rodu *Candida* in *Dekkera*, so sposobni biosintetizirati etilfenole v vinu, saj vsebujejo encima kumarat-dekarboksilazo (Kkdp) in vinilfenol-reduktazo (Vprp). V nasprotju z njimi pa imajo ostale kvasovke (*S. cerevisiae*, *Torulaspora* spp. in *Zygosaccharomyces* spp.) le dekarboskilazno aktivnost in lahko posledično tvorijo le 4-VG in 4-VF (Dias in sod., 2003). Nedavno so odkrili, da lahko 4-etilfenol tvorijo tudi kvasovke *C. cantarellii*, *C. wickerhamii*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaromyces hansenii* in *P. guilliermondii* izolirane iz vinskega okolja, vendar samo v sintetičnem gojišču ali grozdnem soku, ki ne vsebujeta 10 ali več % etanola. Kvasovka *D. bruxellensis* je potem takem edina, ki je v vinu sposobna tvoriti dovolj etilfenolov, da le ti vplivajo na okus in aroma vina (Dias in sod., 2003).

## 1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNE HIPOTEZE

Do danes so mešane fermentacije s kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* preučevali zgolj s spremeljanjem produkcije hlapnih fenolov in splošnih parametrov fermentacije (Dias in sod., 2003; Jensen in sod., 2009; Sáez in sod., 2010). Torej je mogoče, da mikrobne interakcije obstajajo med temo dvema vrstama kvasovk in da jih raziskovalci še niso odkrili. Zato je bil naš prvi cilj ugotoviti, kako kontaminacija s kvasovko *D. bruxellensis* vpliva na rast in na metabolno zmogljivost kvasovke *S. cerevisiae* in posledično na proizvodnjo aromatskih spojin tekom alkoholne fermentacije. V ta namen smo uporabili transkriptomska in metabolomska orodja.

Fermentacija vina je kompleksen proces, ki vključuje mikrofloro vinskih mikroorganizmov in njihove interakcije, kot so na primer: nevtralizem, komenzalizem, mutualizem/sinergizem, amenzalizem ali antagonizem in konkurenco (Fleet, 2003). Zato bi lahko prevzem določenih spojin, kot so hidroksicimetove kisline (HCK) ali vinilfenoli (VF) s strani ene vrste mikroorganizmov vplival na proizvodnjo etilfenolov med fermentacijo vina.

Številne študije so že raziskale vpliv različnih kemičnih faktorjev in različnih temperatur na proizvodnjo hlapnih fenolov, vendar le v primeru fermentacij s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* (Dias in sod., 2003; Benito in sod., 2009). Dodatno smo ugotovili, da so študije, ki so preučevale fermentacije z mešano kulturo kvasovk *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae* (Dias in sod., 2003; Jensen in sod., 2009; Sáez in sod., 2010), bile omejene le na nekaj poskusov. Potemtakem je potrebno opraviti fiziološko študijo, s katero bi lahko ocenili vpliv mikrobne kompeticije/konkurence na porabo prekurzorskih molekul (HCK in vinilfenoli) in na proizvodnjo hlapnih fenolov. Zato je bil naš drugi cilj preučiti vpliv mikrobne konkurence na metabolizem hlapnih fenolov. V ta namen smo naredili serijo fermentacij s čistimi in mešanimi kulturami vinskih kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. V fizioloških poskusih smo spremljali aktivnosti encimov kumarat-dekarboksilaze in vinilfenol-reduktaze in sicer z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) in z metodo PCR-RČ. Ti poskusi so potekali v sintetičnem moštu, ki smo mu dodali prekurzorske molekule ali etanol.

### **Postavili smo naslednji dve raziskovalni hipotezi:**

- Kontaminacija s kvasovko *D. bruxellensis* vpliva na biosintezo aromatskih alkoholov in hlapnih fenolov v vinu.
- Prekurzorske molekule (npr. HCK, VP) in substrat (npr. etanol, glukoza) povečajo produkcijo hlapnih fenolov in višjih alkoholov med mešano fermentacijo kvasovk.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 VPLIV VINSKIH MIKROORGANIZMOV NA FERMENTACIJO VINA

Čeprav vinarstvo sega že v čas starodavne Perzije in Egipta, se je danes industrija vinarjenja razvila v kompleksno tehnologijo sestavljeno iz mikrobioloških in kemijskih metod. Vinarstvo je posledica bioloških in kemijskih interakcij, ki potekajo med sestavinami grozdnega soka in različnimi mikroorganizmi v moštu in vinu (Fleet, 2003). Trenutno potekajo obsežne raziskave, ki želijo preučiti izvor okusa in vonja vina. Čeprav je velik del vinske arome, pridobljen direktno iz grozdja, pa vse arome niso vsebovane v grozdnem jagodi že od samega začetka fermentacije. Del vinskih arom nastane kot posledica delovanja vinskih mikroorganizmov, ki preoblikujejo nehlapne (nearomatične) metabolite grozdja v hlapne aromatične spojine. Mikroorganizmi, ki so običajno povezani s pridelavo vina, so kvasovke, ki so odgovorne za alkoholno fermentacijo in mlečnokislinske bakterije, ki so odgovorne za mlečni razkis vina. Za dosego dobre kakovosti vina je zelo pomembno, da pravi in želeni mikroorganizmi prevladujejo v specifičnih fazah fermentacije (Fleet, 1992; Fleet, 2003; Swiegers in sod., 2005).

Tekom alkoholne fermentacije kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* pretvarjajo grozdnji sladkor v etanol, proizvajajo in izločijo metabolite in na koncu avtolizirajo in sprostijo celično vsebino v okolje (Fleet, 1992; Lambrechts in Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Swiegers in sod., 2005; Jolly in sod., 2006). Čeprav je kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* najpogosteje odgovorna za alkoholno vrenje in sintezo arom vina, pa imajo lahko nekatere ne-*Saccharomyces* kvasovke tudi močan vpliv na končni okus in končno aroma vina (Swiegers in sod., 2005). Vino se lahko potem takem opiše kot produkt kompleksnih interakcij med različnimi mikroorganizmi in kemijskih sestavin grozdnega soka. Ne-*Saccharomyces* kvasovke rodov *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* in *Zygosaccharomyces* s sintezo sekundarnih metabolitov predvsem vplivajo na aromatski profil vina (Pretorius in sod., 1999). Nekatere od teh vrst povzročajo kvar vina in njihov pojav v vinih je nezaželen (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Mlečnokislinske bakterije in ocetno kislinske bakterije imajo lahko zelo močan vpliv na aroma vina. Ocetnokislinske bakterije proizvajajo večje količine acetaldehida in ocetne kisline in s tem povzročajo kvar vina (Drysdale in Fleet, 1988). Od mlečnokislinskih bakterij pa so za vino najpomembnejši naslednji širje rodovi: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* in *Pediococcus* (Davis in sod., 1988). *Oenococcus oeni* je ena od pomembnejših mlečnokislinskih bakterij, saj je odgovorna za nastanek jabolčno-mlečnokislinske fermentacije, znotraj katere pride do pretvorbe jabolčne kisline v mlečno kislino. Slednja pretvorba je pomembna za razkisanje in mikrobiološko stabilnost vin (Wibowo in sod., 1985).

### 2.2 SINTEZA AROMATSKIH SNOVI S KVASOVKO *S. cerevisiae*

Kvasovke vrste *S. cerevisiae* med anaerobno fermentacijo sladkorjev proizvajajo različne aromatske hlapne metabolite, ki prispevajo k senzoričnemu profilu vina (Ugliano in

Henschke, 2009). Večino od njih lahko razdelimo v tri glavne razrede aromatskih snovi, in sicer na više alkohole, estre in na hlapne žveplove spojine (Bisson in Karpel, 2010).

### **2.2.1 Sinteza višjih alkoholov**

Višji alkoholi so alkoholi, ki vsebujejo več kot dva ogljikova atoma. Iz kvantitativnega vidika so to najpomembnejše hlapne komponente, ki nastanejo med fermentacijo sladkorjev. V vinu so zaželeni predvsem v nižjih koncentracijah (do 300 mg/L) (Ugliano in Henschke, 2009). Njihova sinteza se začne z dekarboksilacijo in posledično redukcijo  $\alpha$ -keto kislin.  $\alpha$ -keto kisline nastajajo kot intermediati biosinteze in katabolizma aminokislin (Ehrlichova pot razgradnje). Študije z uporabo radioaktivno označenih aminokislin so pokazale, da se večina višjih alkoholov tvori iz  $\alpha$ -keto kislin, ki so nastale v procesu glikolize in so namenjene za biosintezo aminokislin. Torej je pot biosinteze aminokislin glavni vir intermediatov za produkcijo višjih alkoholov (Ugliano in Henschke, 2009). Obstajata dva razreda višjih alkoholov, in sicer alifatski alkoholi z razvejanimi verigami in aromatski alkoholi. Strukturno pripadajoče aminokisline za alifatske alkohole 2-metilpropanol, 2-metilbutanol in 3-metilbutanol so valin, leucin in izoleucin, za aromatske alkohole 2-feniletanol, tirozol in triptofol pa fenilalanin, tirozin in triptofan. Prevzem valina, leucina in izoleucina poteka preko dveh transportnih permeaz Bap2p in Bap3p ter preko permeaze, ki je splošna vsem aminokislinam Gap1p, prevzem aromatskih aminokislin pa preko permeaz Tat1p, Tat2p, Gap1p in Bap2p (Regenberg in sod., 1999). Transaminacijo valina, leucina in izoleucina do pripadajočih  $\alpha$ -keto kislin katalizirata transferazi Bat1p in Bat2p, transaminacijo aromatskih aminokislin pa transferazi Aro8p in Aro9p. Piruvat-dekarboksilaze (Pdc1p, Pdc5p, Pdc6p, Aro10p) pretvorijo  $\alpha$ -keto kisline v aldehyde, te pa do pripadajočih alkoholov reducirajo encimi aldehid-dehidrogenaze (Adh1p-Adh6p, Sfa1p) (Hazelwood in sod., 2008).

### **2.2.2 Sinteza aromatskih estrov**

Estri se tvorijo v kondenzacijski reakciji med alkoholom in acilno skupino koencima A. Poznamo dve skupini estrov, in sicer etilne in acetatne estre. Etanol je alkoholni ko-reaktant za tvorbo etilnih estrov, acilni del pa izvira iz biosinteze maščobnih kislin. Pri acetatnih estrih poleg etanola ko-reagirajo tudi višji alkoholi, acilni del pa izhaja iz acetil-CoA. Za nastanek etilnih estrov omenjeno reakcijo katalizirata acil-transferazi Eeb1p in Eht1p, za nastanek acetatnih estrov pa predvsem alkohol-transferaza Atf1p, manjšo vlogo pa ima tudi transferaza Atf2p. Acetatni estri kot so na primer etilacetat, 3-metil-butil-acetat in 2-fenil-etil-acetat doprinesejo k sadno-cvetlični aromi, ki je še posebej zaželena v rdečih vinih (Lilly in sod., 2006).

### **2.2.3 Sinteza hlapnih žveplovin**

Hlapne žveplove spojine nastajajo med biosintezo aminokislin, med katabolizmom žveplovsebujočih aminokislin, med razgradnjo glutationa in med razgradnjo žveplo-vsebujočih

vitaminov (biotina in tiamina) (Rauhut, 2009). V nasprotju z estri dajejo hlapne žveplove spojine vinu izrazito značilen in nezaželen vonj.

Glavna spojina v tem razredu je  $H_2S$ , ki se sintetizira tekom redukcije sulfata v procesu asimilacije sulfata. Ima značilen vonj po gnilih jajcih. V pogojih, ki ustrezajo nastajanju  $H_2S$ , se tvorijo tudi metan-tiol in metan-thio-acetat, kar kaže na metabolno povezanost s katabolizmom aminokisline metionina. Transaminacija in razgradnja metionina vodi do biosinteze metionala in metionola (Ugliano in Henschke, 2009). Pri tej reakciji sta pomembni isti transaminazi, Aro8p in Aro9p, kot pri sintezi aromatskih alkoholov (Erlichova pot). Producija metionola je regulirana na podoben način kot biosinteza višjih alkoholov. Hernandez-Orte in sod. (2006) so ugotovili, da se njegova koncentracija povečuje z zniževanjem koncentracije dušika v brozgi.

## 2.3 KONTAMINACIJA S KVASOVKO *D. bruxellensis*

Trenutno rod *Dekkera* spp. (nespolna teleomorfna oblika imenovana *Brettanomyces* spp.) sestavlja pet vrst, in sicer *D. bruxellensis*, *D. anomalus*, *D. custersianus*, *D. naardenensis* in *D. nanus* (Egli in Henick-Kling, 2001). Kvasovka *D. bruxellensis*, nekdaj poznana kot *Dekkera intermedia* ali *Brettanomyces lambicus*, povzroča škodo v industriji vina in v industriji drugih fermentiranih pihač (van der Walt, 1964; Morrissey in sod., 2004; Silva in sod., 2004). Ta kvasovka proizvaja nezaželene snovi kot so: ocetna kislina (Ciani in Ferraro, 1997; Harris in sod., 2008), tetrahidropiridini (Hereszty, 1986; Grbin in Henschke, 2000; Snowdon in sod., 2006), etilacetat (Ciani in Ferraro, 1997; Harris in sod., 2008) izovalerat (Renouf in Lonvaud-Funel, 2007) in hlapni fenoli (Chatonnet in sod., 1992). Dodatno, sama rast kvasovk *Brettanomyces* lahko povzroči motnost vina (van der Walt, 1964) tvori se lahko biofilm, lahko pa vpliva tudi na zbledelost barve vina (Mansfield in sod., 2002).

V zadnjih petnajstih letih se je število študij, ki preučujejo kvasovke *D. bruxellensis*, močno povečalo (Chatonnet in sod., 1995; Guilloux-Benatier in sod., 2001; Conterno in sod., 2006; Renouf in sod., 2006; De Souza Liberal in sod., 2007), kar nakazuje na željo po razumevanju obnašanja teh kvasovk in poskusu ugotavljanja postopkov za preprečevanje in nadzor nastanka neprijetnih priokusov v vinu.

### 2.3.1 Hlapni fenoli in kvar vina

Hlapni fenoli so odgovorni za nastanek fenolnega priokusa v vinu. Glavne skupine hlapnih fenolov so 4-vinilfenol (4-VP), 4-vinilgvajakol (4-VG), 4-etilkatehol, 4-etylfenol (4-EP) in 4-etylgvajakol (4-EG). Poleg fenolnega priokusa lahko povzročajo tudi priokus po "zdravilih", "hlevu", "konjskem znoju", "usnju", po "dimljenem" in po "začinjenem" (Chatonnet in sod., 1992; Rodrigues in sod., 2001). Predvsem 4-etylfenol in 4-etylgvajakol povzročata največjo škodo zlasti v proizvodnji visokokakovostnih rdečih vin zorjenih v hrastovih sodih (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003; Silva in sod., 2004) in sta značilna za okužbo s kvasovko *D. bruxellensis*. Znano je, da je v enoloških pogojih (v prisotnosti 10 %

etanola) samo *D. bruxellensis* sposobna sintetizirati takšne količine etilfenolov, ki lahko negativno vplivajo na okus in aroma vina (Jensen in sod., 2009).

Kontrola kakovosti v procesu vinarstva zagotavlja, da je lahko končni produkt konkurenčen na mednarodnem trgu in da izpoljuje zahteve standardov kakovosti. Kakovost vina se običajno vrednoti glede na vizualne, vohalne in okušalne lastnosti. Različni priokusi kot je na primer fenolni priokus lahko odločilno vplivajo na prodajo vina (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Nezaželeni hlapni fenoli predstavljajo resen problem v vinarski industriji, kjer omenjeni priokusi označijo vino kot nesprejemljivo, kar pa lahko posledično vodi k velikim ekonomskim izgubam.

Nekatere vrste vina so bolj dovzetne za kvar s hlapnimi fenoli kot druge ne glede na to kolikšna je vsebnost etanola ali pH vrednost vina. V belih vinih je pojav nezaželenih fenolnih priokusov bistveno manjši v primerjavi z rdečimi vini (Loureiro in Malfeito-Ferreira, 2003). Rast kvasovke *D. bruxellensis* v belih vinih je mogoče doseči le, če zmanjšamo vsebnost etanola ali če povečamo pH vrednost vina do takih ravni, ki niso več značilne za vino. Za razliko od belih vin pa kvasovka *D. bruxellensis* v rdečih vinih najprej preide v fazo prilagajanja rasti (v lag fazo) tej pa sledi eksponentna faza rasti, ki lahko traja od 61-712 dni (Grbin in Henschke, 2000; Fugelsang in Zoecklein, 2003; Du Toit in sod., 2005). Glaven problem hlapnih fenolov je, da visoke koncentracije povzročijo priokuse, ki prevladajo nad vsakršno sadno aromo rdečega vina (Romano in sod., 2008). Dodatno se v belih vinih najpogosteje pojavljajo vinilfenoli, in sicer v razmerju 4-VF/4-VG 1:1, etilfenoli, ki povzročajo večino škode, pa so le redko prisotni po okužbi s kvasovko *D. bruxellensis*. Po drugi strani pa rdeča vina vsebujejo majhne količine vinilfenolov in relativno velike količine etilfenolov, in sicer v tipičnem razmerju 4-EF/4-EG 8:1 (Chatonnet in sod., 1992).

### 2.3.2 Pozitivni in negativni učinki hlapnih fenolov

Zaznavni prag 4-EF je 230 µg/L in majhne koncentracije 4-EF so zaželene v vinih. 4-EG ima nižji zaznavni prag, 47 µg/L, in manjši vpliv na vinsko aromo v primerjavi s 4-EF, vendar vseeno povzroča priokuse po "slanini" ali po "prekajenem" (Chatonnet in sod., 1990).

Licker in sod. (1999) so ugotovili, da vina, ki ne kažejo nezaželenega »Brett« karakterja vsebujejo okoli 0,68 mg/L 4-etilfenola, vina s srednjim ali visokim »Brett« karakterjem pa vsebujejo 1,74 mg/L ali 3,0 mg/L 4-etilfenola. Običajne vsebnosti hlapnih fenolov v vinu so predstavljene v preglednici 1.

**Preglednica 1: Zaznavni prag za hlapne fenole in njihove koncentracije v rdečem vinu (Curtin in sod., 2005). Simboli: \* sintetično vino; \*\* rdeče vino; \*\*\* voda.**

Table 1: Perceptual thresholds for volatile phenols and their concentrations in red wine (Curtin et al., 2005).  
Symbols: \* synthetic wine; \*\* red wine; \*\*\* water.

Hlapni fenoli	Koncentracija v rdečem vinu ( $\mu\text{g/L}$ )	Zaznavni prag ( $\mu\text{g/L}$ )	Opis arome
4-etilfenol	118-3696	440*/600**	Po fenolih, zdravilih, hlevu
4-etylvgajakol	1-432	33*/110**	Po začinjenem, po klinčkih, po sladkobnem
4-etilkatehol	27-427	30-60**	Po konjskem znoju
4-vinilfenol	8,8-43	20***	Po zdravilih, fenolih
4-vinilvgajakol	0,2-15	10*	Po klinčkih, fenolih

Zaznavni prag vinilfenola je  $20 \mu\text{g/L}$  in vinilvgajakola  $10 \text{ mg/L}$ . Podobno kot etilfenoli imajo tudi vinilfenoli v nizkih koncentracijah neškodljive in celo zaželene aromatične lastnosti, ki spominjajo na "začinjen", "lesnat" in "sladkoben" priokus (Hereszty, 1986; van Beek in Priest, 2000). Ko pa njihova koncentracija preseže  $725 \text{ mg/L}$ , postane njihov vpliv nezaželen, saj se pri teh koncentracijah začnejo pojavljati priokusi po "hlevu", po "živalih", po "zdravilih" in po "fenolih" (Chatonnet in sod., 1992).

### 2.3.3 Prilagodljivost kvasovke *D. bruxellensis*

Kvasovke rodu *Dekkera* spp. se nahajajo v vinogradih in kleteh, kjer so prisotne tako v vodi, zemlji, grozdu kot tudi v moštu (Arvik in Henick-Kling, 2002). Ko se enkrat te kvasovke pojavijo v kleteh, jih je zelo težko odstraniti (Pollnitz in sod., 2000; Arvik in Henick-Kling, 2002). Prvič zaradi nizke ravni higiene v vinarstvu in drugič zaradi prilagodljivosti teh kvasovk na okoljske pogoje alkoholne fermentacije (Suárez in sod., 2007). Predvsem zaradi slednje lastnosti teh kvasovk, morajo mnogi vinarji začasno zapreti kleti in se posvetiti dekontaminaciji prostorov.

Za mikroorganizme predstavlja alkoholna fermentacija fiziološko zahtevne pogoje, kot so visok osmotski tlak, hipoksija, visoke koncentracije sladkorjev, nizke ravni dušika, 11-16 % etanol in nizek pH (Fuglsang, 1997; Guilloux-Benatier in sod., 2001; Dias in sod., 2003; Fuglsang in Zoecklein, 2003). Podobno kot *S. cerevisiae* je tudi *D. bruxellensis* dobro prilagojena na enološke pogoje, saj je tolerantna na etanol, fakultativno anaerobna in »Crabtree« pozitivna (Woolfit in sod., 2007). »Crabtree« pozitivna lastnost pomeni, da kvasovka v prisotnosti velikih koncentracij glukoze proizvaja etanol ne glede na to ali gre za anaerobne ali aerobne pogoje inkubacije. Nardi in sod. (2010) so ugotovili, da med fermentacijo tako *D. bruxellensis* kot *S. cerevisiae* izražata nekaj skupnih regulatorjev odziva na stres (in sicer naslednji geni *MSN4*, *SNF1*, *HSP82* in *NTH1*), kar kaže na to, da so nekateri mehanizmi za prilagoditev na fermentacijsko okolje genetsko ohranjeni znotraj kvasovk. Po koncu alkoholne fermentacije koncentracije sladkorjev upadejo in posledično nastopi faza odmiranja kvasovk *S. cerevisiae*. V tem okolju je populacija kvasovk

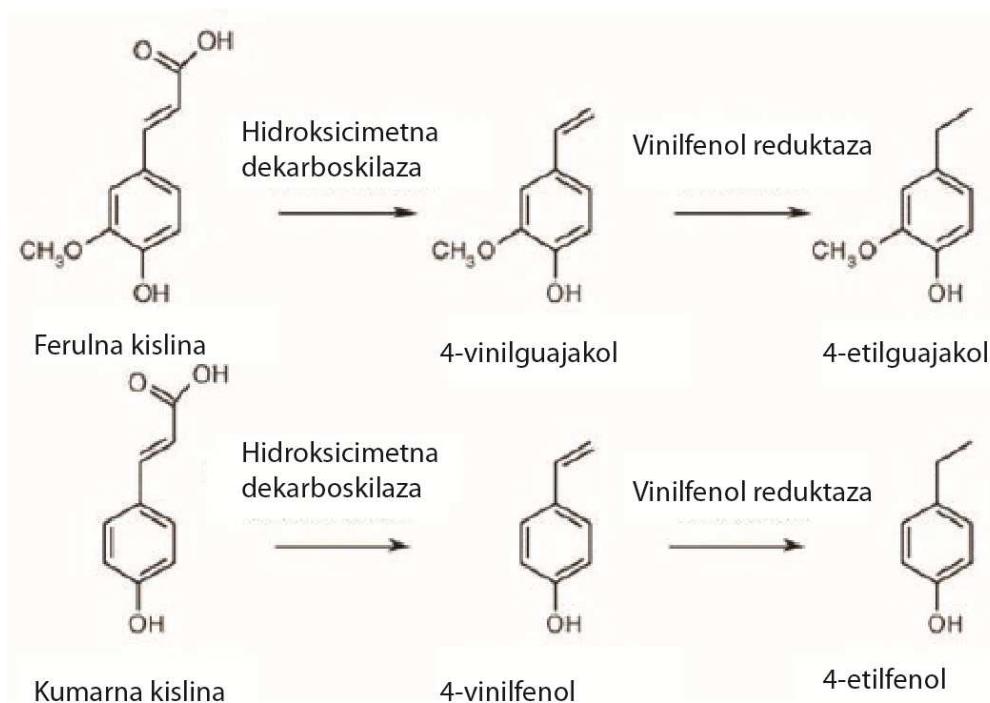
*Brettanomyces* sposobna počasne rasti in lahko ohrani svojo živost za daljše časovno obdobje. Za razliko od kvasovke *S. cerevisiae*, ima *D. bruxellensis* v gojišču z velikimi koncentracijami glukoze neučinkovit prevzem sladkorjev, vendar lahko za metabolizem izrablja različne alternativne vire ogljika (kot so na primer alkoholi: etanol, glicerol,...). Dodatno lahko zelo učinkovito privzemajo glukozo, ko je ta prisotna le še v sledovih (Dias in sod., 2003; Conterno in sod., 2006). Vse te lastnosti ji omogočajo visoko stopnjo preživelosti tekom zorenja vina.

Čeprav mehanizmi prilagajanja na pogoje alkoholne fermentacije še niso poznani, pa so bile narejene že številne študije fiziološkega vpliva kemijskih in fizikalnih dejavnikov na razvoj *D. bruxellensis* v vinu, kot so na primer: kisik in žveplov dioksid (Millet in Lonvaud-Funel, 2000; Du Toit in sod., 2005), koncentracija sladkorja, temperatura (Barata in sod., 2008a), in avtoliza kvasovke *S. cerevisiae* (Guilloux-Benatier in Chassagne, 2003).

## 2.4 SINTEZA HLAPNIH FENOLOV

Kvasovke sintetizirajo hlapne fenole med procesom encimske transformacije fenolnih kislín imenovanih hidroksicimetove kislíne/fenolne kislíne (HCK). HCK so v grozdju običajno prisotne v nizkih koncentracijah, kjer so zaestrene z vinsko kislino lahko pa tvorijo tudi etilne estre, glukozne estre in antocianinske kumarate (Curtin in sod., 2005). Prosta oblika HCK ( $p$ -kumarna ( $p$ -KK), ferulna (FK) in kavna kislina) se sprosti v okolje po delovanju encimov s cinamoil-esterazno aktivnostjo, ki hidrolitično cepijo estersko vez (Dugelay in sod., 1993; Stead, 1995; Oelofse in sod., 2008).

HCK v rastlinskih celicah grozdne jagode delujejo kot naravni toksini in zavirajo rast patogenih mikroorganizmov (Barthelmebs in sod., 2001). Nekateri mikroorganizmi lahko proste HCK pretvorijo do manj toksičnih derivatov. Pri tem se HCK najprej dekarboksilirajo v hidroksistirene (4-vinilfenol 4-VF, 4-vinilgvajakol 4-VG in 4-vinilkatehol) (Edlin in sod., 1995), ti pa se reducirajo v pripadajoče etilne-derivate (4-etilfenol 4-EF, 4-etilgvajakol 4-EG in 4-etilkatehol) (Chatonnet in sod., 1992; Dias in sod., 2003). Za ti dve reakciji sta torej potrebna encima s fenolno kislinsko dekarboksilazno aktivnostjo in z vinilfenolno reduktazno aktivnostjo (slika 1).



**Slika 1: Shema encimske biotransformacije hidroksicimetovih kislin (HCK) v vinilfenole in etilfenole (Botelho in sod., 2011).**

Figure 1: The scheme of enzymatic biotransformation of hydroxycinnamic acids (HCK) to vinylphenols and ethylphenols (Botelho et al., 2011).

Kvasovka *D. bruxellensis* pa ni edina, ki lahko proizvaja hlapne fenole. Med proizvajalke spadajo tako *Saccharomyces* (Chatonnet in sod., 1993) kot ne-*Saccharomyces* kvasovke (Shinohara in sod., 2000; Dias in sod., 2003; Barata in sod., 2006) in nekatere mlečno kislinske bakterije (Cavin in sod., 1993; Chatonnet in sod., 1995; Couto in sod., 2006). Raziskave so pokazale, da ne-*Saccharomyces* kvasovke kot so *Rhodotorula* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Pichia* spp. in *Hansenula* spp. lahko sintetizirajo veliko količino vinilnih fenolov v umetnem gojišču dopolnjem s kumarno in ferulno kislino (Shinohara in sod., 2000). Presenetljivo so Dias in sod. (2003) ugotovili, da lahko vinska kvasovka *Pichia guilliermondii* v sintetičnem soku pretvori kumarno kislino v 4-EF. Preizkusili so tudi kvasovke *Candida cantarelli*, *Candida wickerhamii*, *Debaryomyces hansenii* in *Kluyveromyces lactis*, za katere pa so ugotovili, da je njihova sinteza 4-EF bistveno nižja v primerjavi s kvasovkama *D. bruxellensis* in *Picia guilliermondii* (Dias in sod., 2003; Barata in sod., 2006; Martorell in sod., 2006; Sangorrin in sod., 2008). Lopes in sod. (2009) so opazili, da se kvasovka *P. guilliermondii* razlikuje od kvasovke *D. bruxellensis* po visoki produkciji 4-VG in 4-VF in nizki produkciji 4-EG in 4-EF.

#### 2.4.1 Dekarboksilaze za fenilakrilične kisline v vinskih mikroorganizmih

Dekarboksilaze za fenilakrilične kisline so bile najprej okarakterizirane pri bakterijah in šele nato pri kvasovkah (Clausen in sod., 1994; Cavin in sod., 1997; Edlin in sod., 1998; Barthelmebs in sod., 2000a; Stratford in sod., 2007). Bakterijske vrste, ki vsebujejo to

vrsto dekarboksilaz so: *Pseudomonas fluorescens* (Huang in sod., 1994), *Lactobacillus plantarum* (Cavin in sod., 1997; Rodriguez in sod., 2007), *Bacillus subtilis/pumilus* (Degrassi in sod., 1995; Zago in sod., 1995; Cavin in sod., 1998), *Pediococcus pentosaceus* (Barthelmebs in sod., 2000b) in *Klebsiella oxytoca* (Hashidoko in sod., 2001). V bakterijah so dekarboksilaze, ki so homologne kvasnim dekarboksilazam, sestavljene iz homodimernih podenot in imajo skupno molekulsko maso okoli 41–45 kDa (Huang in sod., 1994; Degrassi in sod., 1995; Cavin in sod., 1998; Rodriguez in sod., 2007). Bakterijske dekarboksilaze so del inducibilnega stresnega odziva na prisotnost HCK (Barthelmebs in sod., 2000a). Bakterijske sekvence homolognih dekarboksilaz kažejo med seboj 64–84 % podobnost v aminoksilinskem zaporedju (Cavin in sod., 1998; Barthelmebs in sod., 2000a) in nobene podobnosti z dekarboksilazami, ki izvirajo iz kvasovk (Cavin in sod., 1998).

#### 2.4.2 Dekarboksilaze za fenolne kisline kvasovke *S. cerevisiae*

Shinohara in sod. (2000) so ugotovili, da je sinteza vinilnih fenolov v kvasovki *S. cerevisiae* odvisna od gena, ki zapisuje encim kumarat-dekarboksilazo (869 baznih parov velik PCR produkt, ki vsebuje gen *PAD1*). Gen *PAD1* ima v kvasnem genomu eno samo kopijo (Clausen in sod., 1994) in se nahaja na kromosomu IV kvasovke *S. cerevisiae*. Gen kodira dekarboksilazo Pad1p, ki ima nizko afiniteto do ferulne in kumarne kisline, zato raziskovalci predvidevajo, da ta encim ni sposoben sintetizirati dovolj vinilnih fenolov, da bi prišlo do pojava fenolnih priokusov v vinu (Clausen in sod., 1994).

Za razliko od konstantnega izražanja gena *PAD1* iz kvasovke *S. cerevisiae* pa se izražanje genov, ki kodirajo dekarboksilazo za fenilakrilično kislino (*PADC*) iz bakterije *Bacillus subtilis* in dekarboksilazo za kumarno kislino (*PDC*) iz bakterije *Lactobacillus plantarum*, poveča ob dodatku HCK (Degrassi in sod., 1995).

Smit in sod. (2003) so ugotovili, da je industrijski sev kvasovke *S. cerevisiae* s prekinjenim genom *PAD1* (VIN13[ΔPOF]) še vedno sintetiziral 4-VF v vinih *Chardonnay* in *Renski rizling*, kar kaže na to, da je v kvasovki prisotna še dodatna HCK-dekarboksilaza. V tem primeru je najverjetnejše šlo za aktivnost encima kodiranega z genom *FDC1*. Ugotovili so, da se gen *FDC1* v genomu nahaja v neposredni bližini gena *PAD1*, in sicer na kromosomu IV kvasovke *S. cerevisiae*.

Encima Pad1p in Fdc1p sta po aminokislinskem zaporedju homologna bakterijskim ne-oksidativnim hidroksiakrilat-dekarboksilazam/fenol-karboksilazam, ki jih kodirajo trije klasterji genov in sicer B, C in D in so veliki 0,6; 1,4 in 0,2 kbp. Liu in sod. (2007) so ugotovili, da geni B, C in D iz genoma bakterije *Chlamydophila pneumoniae* AR39 zapisujejo tri proteinske podenote (podenota B, C in D), ki skupaj tvorijo encimski kompleks in sodelujejo v procesu dekarboksilacije v biosintezi poti nastanka ubikinona. V skladu s tem so Mukai in sod. (2009) ugotovili, da skupaj z nekaterimi drugimi dekarboksilazami tudi encima Pad1p in Fdc1p sodelujeta v biosintezi ubikinona. Ubikinon je nujen za elektronski transport v mitohondrijih in posledično nujen za respiratorni metabolizem kvasovke. Bakterijski protein kodiran z genom C vsebuje aminokislinski motiv E-X-P, ki pa je ohranjen tudi v proteinu Fdc1p. Liu in sod. (2007) so za bakterijske

4-hidroksibenzoat-dekarboksilaze dokazali, da je motiv E-X-P odgovoren za vezavo (hidroksilnih)-akrilnih kislin. Potemtakem lahko v kvasovkah služi za vezavo HCK.

#### 2.4.2.1 Transformacija bakterijskih dekarboksilaz v kvasovko *S. cerevisiae* z namenom izboljšanja arome vina

Smit in sod. (2003) so želeli razviti vinsko kvasovko *S. cerevisiae*, ki bi bila sposobna optimizirane dekarboksilacije fenolnih kislin do optimalnih in zaželenih koncentracij vinilfenolov v vinu. S tem namenom so klonirali gene *PADC*, *PDC*, in *PAD1* pod konstitutivni fosfoglicerat-kinazni promotor (PGK1P) in terminator PGK1T kvasovke *S. cerevisiae*. Ta genski konstrukt so vključili v ura3 lokus laboratorijskega seva *S. cerevisiae*, Σ1278b. Gena *PADC* in *PDC* so transformirali tudi v industrijski sev *S. cerevisiae* VIN 13. Encimski testi z uporabo kvasnih ekstraktov z dodanimi HCK so v primeru laboratorijskih transformantov pokazali, da je povečanje ekspresije genov *PADC* in *PDC* povzročilo večjo encimsko aktivnost (približno 2x večjo), povečanje ekspresije gena *PAD1* pa ni signifikantno izboljšalo aktivnosti encima Pad1p. Industrijske transformante so preskusili v fermentaciji vin *Chardonnay* in *Renski rizling*. Producija 4-VF je bila večja v vinih *Chardonnay* v primerjavi z vini *Renski rizling*. Ker 4-VF pri koncentracijah nad 4 mg/L povzroča fenolne priokuse in ker je idealna zaželena koncentracija 4-VF v vinu okoli 2,2 mg/L, ima transformacija genov *pdc* in *padc* v *S. cerevisiae* negativen učinek na aromatski profil vina.

Za razliko od neuspelih poskusov izboljšanja arome fermentiranih vin s transformiranimi vinskimi sevi pa so transformacije pivskih sevov kvasovke *S. cerevisiae* uspešno prispevale k okusu in vonju piva. Cao in sod. (2010) so uspešno klonirali gen *PADC* iz bakterije *B. subtilis* v industrijski pivski sev W303-1A kvasovke *S. cerevisiae*. Rezultati so pokazali, da je bila sinteza 4-VG povečana glede na divji tip seva, in sicer iz 1,20 mg/L v divjem tipu do 1,70 mg/L v transformantu. Nastale koncentracije 4-VG so prispevale k izboljšanju zaželene arome piva in so poudarile zaželeni okus po klinčkih.

#### 2.4.3 Dekarboksilaze za fenolne kisline v kvasovkah *Dekkera* spp.

Edlin in sod. (1998) so v kvasovki *Dekkera anomala* delno okarakterizirali encim, ki dekarboksilira HCK. Ugotovili so, da se aktivnost tega encima inducira v prisotnosti HCK. Encim so opisali kot homodimerni protein, velik 39,8 kDa, ki specifično deluje na kavno, kumarno in ferulno kislino. N-terminalno sekvenciranje aminokislinskega zaporedja izoliranega encima je razkrilo, da zaporedje ne kaže nobene podobnosti z ostalimi kvasnimi ali bakterijskimi dekarboksilazami, in da je homologno N-terminalnemu delu odprtrega bralnega okvirja (ORF) YDR032C kvasovke *S. cerevisiae*. Odprti bralni okvir YDR032C je homologen genu *PST2* iz kvasovke *Candida albicans*, ta pa je vpletten v odziv kvasovke na oksidativni stres in v rezistenco na droge (Karababa in sod., 2004). Gen YDR032C so klonirali in izrazili v bakteriji *E. coli*, vendar niso opazili nobene dekarboksilazne aktivnosti transformiranih celic (Edlin in sod., 1998). Potemtakem gre za neobičajen encim s dekarboksilazno aktivnostjo kvasovke *D. anomala*.

Harris in sod. (2009) so z nadaljnjam sekvenciranjem aminokislinskega in cDNA zaporedja za encim Padp določili skoraj celotno sekvenco proteina. Majhne razlike v sekvencah

pridobljenih s proteinskim in RACE (cDNA sekvenciranje) sekvenciranjem nakazujejo na verjetno prisotnost vsaj dveh izoformnih oblik tega gena v genomu kvasovke *Dekkera anomala*. Aminokislinska sekvenca je razkrila prisotnost vezavnega mesta za flavodoksin mononukleotid. Proteina Padp in Pst2p identificirana v predhodnih študijah spadata med flavoproteinske ali flavodoksinske družine proteinov (Grandori in Carey, 1994; Rangarajan in sod., 2004). Ta dva proteina imata različne funkcije, vendar oba vsebujejo vezavno mesto za flavin mononukleotid. Kljub različnim funkcijam obstaja podobnost v njunem delovanju. Protein Pst2p iz kvasovk *Saccharomyces* ali *Candida* spp. se nahaja v mitohondriih, kjer se njegova aktivnost močno poveča ob nastanku reaktivnih kisikovih radikalov (Karababa in sod., 2004), protein Padp pa dekarboksilira HCK, ki povzročajo oksidativni stres. Dodatno sta oba proteina Padp in Pst2p vpletena v rezistenco proti komponentam rastlinskih celic, ki vsebujejo protimikrobnou aktivnost (Clausen in sod., 1994; Pardo in sod., 2000).

#### **2.4.4 Vinilfenol-reduktaze v vinskih mikroorganizmih**

Encim vinilfenol-reduktaza je nujen za redukcijo vinilfenolov do pripadajočih etilnih derivatov. Čeprav so redukcijsko sposobnost opazili že pri bakterijah rodu *Lactobacillus* spp. (Couto in sod., 2006) in kvasovkah vrste *Pichia guilliermondii* (Dias in sod., 2003), pa je kvasovka *D. bruxellensis* edina, ki je v vinu (oziroma v prisotnosti 10 % etanola) sposobna sintetizirati dovolj etilnih fenolov, da le ti povzročijo stranski priokus po fenolnih snovev v vinu (Dias in sod., 2003).

#### **2.4.5 Encim z vinilfenol-reduktazno aktivnostjo kvasovke *Dekkera bruxellensis***

Tchobanov in sod. (2008) so bili prvi, ki so izolirali in delno okarakterizirali encim vinilfenol-reduktazo (Vprp) kvasovke *Dekkera bruxellensis*. SDS Page elektroforeza je pokazala, da je ta reduktaza monomerni protein z molekulsko maso 26 kDa. S tripsinsko razgradjo in sekvenciranjem izoliranega proteina iz SDS Page gela so določili sekvence treh peptidov (NLPRIDFTLNLP; GFLTIQYDSGK; HRYVFLLYKQTPGVVT) in jih s programom BLASTp primerjali z NCBI bazo podatkov. Rezultati poravnava zaporedji so pokazali, da se peptidna zaporedja ne ujemajo z nobenim poznanim proteinom v bazah podatkov.

Maksimalna aktivnost encima Vprp nastopi v pozni fazni rasti celic *D. bruxellensis* (Tchobanov in sod., 2008). Podobno so Edlin in sod. (1998) ugotovili, da ima tudi dekarboksilaza Padp iz kvasovke *Dekkera anomala* največjo aktivnost v pozni eksponentni fazni rasti celic. Ker oba encima spadata pod isto metabolno pot, ne preseneča, da sta tudi gena, ki ju zapisujeta, konstitutivno izražena in da imata oba največjo aktivnost v pozni eksponentni fazni rasti. Tchobanov in sod. (2008) so nadalje ugotovili, da encim Vprp specifično veže 4-VG in 4-VF in da je njegova aktivnost inhibirana s substrati, ki vsebujejo karboksilno skupino (kot so na primer: cimetova, ferulna ali kumarna kislina). Potem takem so ugotovili, da encim ni sposoben direktno reducirati HCK v grozdni brozgi.

## 2.5 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA RAST KVASOVKE *D. bruxellensis* IN NA PRODUKCIJO HLAPNIH FENOLOV V VINU

Biosinteza hlapnih fenolov v vinu je odvisna od prisotnosti prekurzorskih molekul HCK, od koncentracije etanola, od sevne specifičnosti kvasovke *D. bruxellensis* in od velikosti njene populacije (Gerbaux in sod., 2000). Vinarji se poslužujejo številnih strategij, ki preprečujejo razvoj in rast kvasovke *D. bruxellensis*, vendar je učinkovitost teh metod pogosto vprašljiva predvsem zaradi slabe preventive, neučinkovitega preprečevanja okužb in zaradi omejenega razumevanja fiziologije in metabolizma teh kvasovk, še posebej v mešanih kulturah skupaj s komercialnimi vinskimi sevi kvasovke *S. cerevisiae*. Odločilnega pomena je prepoznati, pod katerimi pogoji lahko kvasovka *D. bruxellensis* postane kompetitivna, se namnoži in povzroči resne okvare vina z izločanjem visokih koncentracij hlapnih fenolov. S poznanjem teh pogojev bo mogoče vzpostaviti ustrezne ukrepe za nadzor fermentacije in proizvodnje vina (Vigentini in sod., 2008).

Dodatno so fiziološki testi preživetja in razvoja kvasovke *D. bruxellensis* v pogojih fermentacije vina pokazali (Barata in sod., 2008a), da je uporaba agresivnih kemičnih sredstev za popolno odstranitev prisotnosti kvasovke *D. bruxellensis* neprimerena in da je bolje zmanjšati ali preprečiti njen proizvodnjo hlapnih fenolov. To še posebej velja za visokokakovostna vina, pri katerih je uporaba stabilizacijskih in dezinfekcijskih metod nezaželena, saj lahko le te vplivajo na samo koncentracijo zaželenih aromatskih snovi.

### 2.5.1 Vpliv prekurzorskih molekul iz grozdnih jagod

V naslednjih podpoglavljih so predstavljeni vplivi hidroksicimetovih kislin na rast kvasovk in na sintezo hlapnih fenolov.

#### 2.5.1.1 Izvor hidroksicimetovih kislin

Koncentracija HCK v groznih jagodah močno vpliva na kumulativno koncentracijo hlapnih fenolov v vinu (Suárez in sod., 2007). Različne sorte grozdja se razlikujejo v vsebnosti fenolnih kislin v jagodah (Rodrigues in sod., 2001). Kavna, ferulna in kumarna kislina so vezane z vinsko kislino (kaftarična kislina, fertarična kislina in koutarična kislina) (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Na splošno vsebuje trta *Vitis vinifera* 150 mg/L kaftarične, 20 mg/L koutarične in 1 mg/L fertarične kisline (Rentzsch in sod., 2007). Ostale sorte vsebujejo večje količine HCK, na primer *Grenache* vsebuje od 270-460 mg/L kaftarične kisline (Morel-Salmi in sod., 2006). Za nekatere druge sorte se vsebnosti spet gibljejo med 50-60 mg/L (Rentzsch in sod., 2007).

Kaftarična kislina je prekurzor za nastanek 4-vinilatehola in 4-etilatehola, *p*-kumarna kislina je prekurzor za nastanek 4-vinilfenola in 4-etilfenola in ferulna kislina je prekurzor za nastanek 4-vinilgvajakola in 4-etilgvajakola. Med fermentacijo delujejo esterazni encimi iz kvasovk, ki sprostijo HCK v grozno brozgo. Cabrita in sod. (2008) so pokazali, da se proste hidroksicimetove kisline sproščajo tudi med postopkom malolaktične fermentacije mlečnokislinskih bakterij. Opazili so, da je tekom mlečnega razkisa povprečna koncentracija kaftarične, koutarične in fertarične kisline padla iz 5,33 mg/L na 0,46 mg/L.

Te vrednosti nakazujejo na dejstvo, da se določen delež kavne, *p*-kumarne in ferulne kisline sprosti med potekom hidrolize cinamoil-glukozidnih antocianinov kot tudi drugih hidroksicimetovih derivatov.

Ostali faktorji, ki lahko vplivajo na vsebnost HCK v grozdju so: geografsko poreklo vinske trte in stopnja zrelosti in izpostavljenost soncu (Van Wyk in Rogers, 2000; Geny in sod., 2003). Ker se vsebnost HCK povečuje med procesom zorenja grozdnih jagod na soncu, sta Van Wyk in Rogers (2000) ugotovila, da lahko dosežemo nižjo vsebnost ferulne kisline in posledično manjše koncentracije 4-EG v vinu, če zaščitimo grozdne jagode pred sončno svetlobo s posebnimi prevlekami ali če opravimo trgatev v zgodnejšem obdobju zorenja jagod.

Čeprav lahko v grozdnem soku koncentracija *p*-kumarne kisline doseže do 60 mg/L (Chatonnet in sod., 1997), pa njena koncentracija v vinu po alkoholni fermentaciji ne presega 8 mg/L (Goldberg in sod., 1998). Na tolikšno izgubo HCK lahko vplivajo različni biološki in fizikalno-kemijski dejavniki. Geny in sod. (2003) so ugotovili, da lahko okužba trte s plesnijo *Botrytis cinerea* vpliva na znižanje vsebnosti ferulne kisline v grozdnih brozgi. Nadalje lahko visoke temperature (nad 30 °C) znižajo stabilnost in obstojnost *p*-kumarne kisline (Salameh in sod., 2008). Izguba v koncentraciji je lahko tudi posledica ponovne vezave in esterifikacije HCK. Tako kot vsi drugi polifenoli se lahko tudi prosta *p*-kumarna kislina poveže z etanolom, pri čemer nastane ester. Poznano je, da ta reakcija esterifikacije narašča s povečevanjem koncentracije etanola (Dugelay in sod., 1993). Dodatno so številne raziskave ugotovile, da se lahko del HCK adsorbira v celične stene kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*, pri čemer sama koncentracija v gojišču upade (Morata in sod., 2003; Medina in sod., 2005; Morata in sod., 2005; Rizzo in sod., 2006). Torej temperaturna labilnost, reaktivnost z etanolom in adsorpcija na celične stene so glavni dejavniki, ki lahko povzročijo od 10 do 50 % izgubo v razpoložljivosti prostih HCK.

### 2.5.1.2 Vpliv hidroksicimetovih kislin na zaviranje rasti kvasovke *D. bruxellensis*

Dias in sod. (2003) so pokazali, da povečanje koncentracije *p*-kumarne kisline iz 10 mg/L na 100 mg/L ni imelo negativnega vpliva na rast kvasovke *D. bruxellensis* in na sintezo 4-etylfenola. Posledično so v raziskavah produkcije hlapnih fenolov najpogosteje uporabljali 100 mg/L *p*-kumarne kisline, kar je posledično povečalo aktivnost kumarat-dekarboksilaze (KkdP) kvasovke *D. bruxellensis* in proizvodnjo hlapnih fenolov (Dias in sod., 2003; Godoy in sod., 2008; Harris in sod., 2009). Za razliko od Diasa in sod. (2003) pa so Harris in sod. (2008) ugotovili, da 100 mg/L HCK lahko zavira rast nekaterih sevov kvasovke *D. bruxellensis*. Dodatno so ugotovili, da so večje koncentracije HCK (2 mM) opazno inhibirale rast vseh testiranih sevov te kvasovke. Testiranja so opravili v umetnem vinu predhodno fermentiranem s komercialnim sevom kvasovke *S. cerevisiae*. Etanol, ki ga je sintetizirala kvasovka *S. cerevisiae*, bi potem takem lahko povečal inhibitorni vpliv HCK. Nadalje so Couto in sod. (2005) testirali visoke koncentracije HCK (500 mg/L ferulne ali vanilinske ali kavne ali galne kisline) in vse omenjene kisline so bistveno skrajšale čas, ki je potreben za 90 % inaktivacijo kvasovk *D. bruxellensis*, pri čemer je imela ferulna kislina najmočnejši vpliv.

Prave grozdne brozge ne vsebujejo le posameznih izoliranih HCK, ampak se v njih pojavljajo izključno le kombinacije različnih vrst HCK (tako imenovane mešanice HCK). Potem takem lahko transformacijo v hlapne fenole preučujemo le z uporabo kombinacij HCK. Harris in sod. (2008) so preučili inhibitorni vpliv kombinacij različnih vrst HCK. Ugotovili so, da je kombinacija ferulne in *p*-kumarne kislina imela večji inhibitorni vpliv na rast sevov v primerjavi z dodajanjem posameznih HCK kislin. Kombinacije HCK, ki so vsebovale tudi kavno kislino, so najbolj zavrle rast. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Oelofse in sod. (2009), pri čemer so nadalje ugotovili, da je kombinacija *p*-KK (kumarna kislina) in FK (ferulna kislina) (v skupni koncentraciji 200 mg/L) vplivala tudi na končno raven proizvedenih 4-EG in 4-EF. Opazili so, da so nekateri sevi le s težavo pretvorili *p*-KK in FK v etilfenole, za večino pa je bila pretvorba le nekoliko zakasnjena. Koncentracije etilnih derivatov so se med sevi bistveno razlikovale in so bile nižje v primerjavi z gojiščem, ki je vsebovalo le eno ali drugo vrsto HCK. Za nižjo sintezo hlapnih fenolov imajo avtorji dve razlagi. Prvič, obe vrsti HCK skupaj bi lahko sprožili močnejši inhibitorni učinek na rast kvasovk in s tem daljšo lag fazo rasti, kar bi posledično povzročilo nižjo raven biosinteze encimov Kkdp in Vprp. Mogoča pa je tudi druga razlaga, ki trdi da so visoke koncentracije *p*-KK in FK sprožile nasičenje vezavnih mest na encimih Kkdp in Vprp in so posledično dosegle njihovo maksimalno stopnjo pretvorbe. Ni še povsem jasno ali lahko *p*-KK in FK vplivata druga na drugo in ali lahko tekmujeta v svojem privzemcu, transportu in inhibiciji.

## 2.5.2 Vpliv koncentracije etanola

Toksičnost etanola je povezana z njegovo topnostjo v membranskih lipidih vinskih kvasovk. Celične stene anaerobno gojenih kvasovk imajo, v primerjavi z aerobno gojenimi kvasovkami, nižjo vsebnost sterolov, fosfolipidov in poli-nenasičenih maščobnih kislin, kar prispeva k zmanjšani odpornosti celic na etanol (Larue in sod., 1991; Medawar in sod., 2003). Čeprav se zdi, da so vinske kvasovke bolj tolerantne na visoke koncentracije etanola (Carrasco in Querol, 2001), pa je etanol še vedno glavni stresni dejavnik fermentacije vina (Bisson, 1999) in toleranca nanj je gotovo najpomembnejši faktor, ki omogoča preživetje in rast kvasovk v vinu (Barata in sod., 2008a).

### 2.5.2.1 Vpliv etanola na rast kvasovke *D. bruxellensis*

Nekatere raziskave trdijo, da je *D. bruxellensis* v primerjavi s kvasovko *S. cerevisiae* bolj tolerantna na etanol (Silva in sod., 2004), spet druge raziskave trdijo ravno obratno (Barata in sod., 2008a). Vse pa se strinjajo z dejstvom, da je toleranca na etanol sevno specifična in da se razlikuje znotraj vrste.

Barata in sod. (2008a) so ugotovili, da lahko samo kvasovka *S. cerevisiae* raste v prisotnosti 16 % (v/v) etanola, medtem ko sta dva od najbolj odpornih sevov kvasovke *D. bruxellensis* tolerirala največ 15 % (v/v) etanola, večina sevov kvasovke *D. bruxellensis* (20 od 29) pa je bila inhibirana že pri 14,5 % alkoholu. Nadalje so pokazali, da je bila toleranca kvasovke *D. anomala* bistveno nižja v primerjavi s kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*, saj je bila njena rast popolnoma inhibirana že v prisotnosti 8 % (v/v) etanola.

### 2.5.2.2 Vpliv etanola na biosintezo hlapnih fenolov kvasovke *D. bruxellensis*

Številne raziskave so ugotovile, da se v vinih z višjo vsebnostjo etanola redkeje pojavljajo neprijetni prikusi po etilfenolih (Rodrigues in sod., 2001; Dias in sod., 2003). Dias in sod. (2003) so preučevali vpliv etanola v koncentracijskem rangu od 4-13 % (v/v) na produkcijo 4-EF. Ugotovili so, da povečevanje koncentracije etanola do 10 % vpliva zgolj izključno na rast kvasovk in ne vpliva na samo produkcijsko stopnjo 4-EF. Pri 12 % sta bili rast in produkcija bistveno nižji, pri 13 % pa je prišlo do popolnega zavrtja obeh procesov. V nasprotju s tem so Benito in sod. (2009) v prisotnosti 15 % etanola opazili tako rast biomase kot tudi produkcijo 4-EF kvasovke *D. bruxellensis*. Nadalje so ugotovili, da je v primerjavi s kontrolo, 10 % etanol povzročil zakasnjeno sintezo 4-EF, in sicer za 72 ur, 15 % etanol pa za kar 168 ur, vendar je bila sama transformacija v 4-EF v obeh primerih skoraj 90 %.

Ganga in sod. (2011) so pokazali, da ima povečana koncentracija etanola (6,5 % (v/v) ali več) negativni vpliv na izražanje gena *KKD* kvasovke *D. bruxellensis*. Nadalje so Godoy in sod. (2008) ugotovili, da etanol vpliva tudi na samo aktivnost encimov Kkdp in Vprp te kvasovke. Po nekaj minutah inkubacije v prisotnosti 10 % (v/v) ali 12 % (v/v) etanola so opazili drastično zmanjšanje aktivnosti encima Kkdp. Po 10 minutah inkubacije je encim izgubil 50 % svoje aktivnosti in po 1 h je bila njegova aktivnost že popolnoma izničena. Stabilnost encima Vprp se je postopno zmanjševala v prisotnosti 10 % in 12 % etanola. Po 1 h inkubaciji v prisotnosti 10 % etanola je encim izgubil 80 % svoje aktivnosti, medtem ko se je pri 12 % koncentraciji njegova encimska aktivnost zmanjšala za 88 %. Potemtakem je aktivnost encima Kkdp bolj občutljiva na etanol v primerjavi z aktivnostjo encima Vprp.

### 2.5.2.3 Vpliv etanola na porabo sladkorjev kvasovke *D. bruxellensis*

Kvasovki *D. bruxellensis* (Silva in sod., 2004) in *D. anomala* (Gerós in sod., 1999) vsebujeta dva transportna sistema za glukozo: prvi je visoko afinitetni monosaharidni H<sup>+</sup> simporter, ki deluje samo takrat, ko je koncentracija glukoze manjša od 0,01 % (prenos ene molekule sladkorja na en proton); in drugi je olajšana difuzija, ki deluje pri visokih ali srednjih koncentracijah glukoze. Te kvasovke lahko z visoko afinitetnim simporterjem privzemajo sladkorje, ki se niso porabili tekom alkoholne fermentacije in so prisotni samo še v sledovih (Silva in sod., 2004). Silva in sod. (2004) so ugotovili, da so koncentracije etanola, ki se pojavljajo v vinu (12 % v/v), popolnoma inhibirale difuzijski transport, medtem ko je bila aktivnost visoko afinitetnega transporta znižana le za 60 %. Te ugotovitve lahko pripomorejo k razumevanju mehanizmov preživetja *Dekkera* spp. v neugodnih pogojih fermentacije. Potemtakem lahko visoko afinitetni transportni sistem po zaključeni alkoholni fermentaciji še vedno privzema rezidualne sladkorje in kvasovki *D. bruxellensis* omogoča dolgotrajno preživetje tekom zorenja vina.

### 2.5.2.4 Vpliv etanola na prevzem prekurzorjev

Zmanjšana proizvodnja hlapnih fenolov je posledica tudi spremenjenega privzema in transporta hidroksicimetovih kislin v celico. Pri pH 3,4 so cimetove kisline kemično nedisocirane in ker so lipofilne jim to omogoča, da lahko v celico vstopijo z difuzijo.

Znotraj celice HCK deprotonirajo, sprostijo proste protone in tako povzročijo zakisanje citoplazme. Da bi se kvasovke izognile toksičnim učinkom teh kislin, jih metabolizirajo do hlapnih fenolov, protone pa odstranijo s pomočjo membranskih ATPaz (Agnolucci in sod., 2010). Ganga in sod. (2011) so pokazali, da večje koncentracije etanola pomembno zmanjšajo hitrost prehoda HCK v celico. Glede na dejstvo, da etanol v splošnem pospešuje pasivno difuzijo in zavira aktivni transport preko prenašalnih proteinov v membrani (Sousa in sod., 1996), je potem takem mogoče, da poleg pasivne difuzije obstaja še aktivni transport HCK v celico, ki ga etanol inhibira. Po drugi strani pa lahko prisotnost etanola v fermentacijskem gojišču povzroči spremembo v strukturi celične membrane kvasovke *D. bruxellensis*, kar lahko negativno vpliva na pasivno difuzijo HCK v znotrajcelični prostor. Dodatno bi lahko etanol vplival tudi na samo ATPazo ali pa na njeno okolico (Chambel in sod., 1999).

### 2.5.3 Vpliv raznolikosti sevov kvasovke *D. bruxellensis*

Conterno in sod. (2006) so ugotovili, da sta eni od najbolj spremenljivih lastnosti sevov kvasovke *D. bruxellensis* prav rast biomase in produkcija hlapnih fenolov.

#### 2.5.3.1 Vpliv raznolikosti sevov na rast kvasovke *D. bruxellensis*

Producija hlapnih fenolov se začne ob koncu lag faze in narašča tekom eksponentne faze rasti kvasovke *D. bruxellensis* (Dias in sod., 2003; Barata in sod., 2008b; Agnolucci in sod., 2009). Barata in sod. (2008b) so pokazali, da je proizvodnja 4-etilfenola odvisna od aktivnosti populacije kvasovk *D. bruxellensis* in od dosežene količine biomase. Ugotovili so, da se produkcija hlapnih fenolov povečuje samo, kadar kvasovka raste ne glede na to ali gre za inkubacijo v vinu ali moštu (Barata in sod., 2008b).

Barbin in sod. (2008) so opazili, da imajo različni sevi različne vzorce rasti in privzema sladkorjev. Za razliko od prejšnjih študij so ugotovili, da se produkcija 4-etilfenola razlikuje od seva do seva in da je za nekatere seve neodvisna od rasti in koncentracije biomase. Spet pri drugih sevih je bila produkcija združena z rastjo in je naraščala s koncentracijo biomase. Te ugotovitve so skladne z opažanjem v vinarstvu, kjer pokvarjena vina pogosto vsebujejo visoko koncentracijo 4-etilfenola, vendar relativno nizko stopnjo rasti celic *Dekkera bruxellensis*, medtem ko vsebujejo spet druga vina gosto populacijo te kvasovke in tako majhne količine 4-etilfenola, da ne povzročajo neprijetnih fenolih priokusov (Barbin in sod., 2008).

#### 2.5.3.2 Vpliv vrst in raznolikosti sevov na prevzem hidroksicimetovih kislin

Hereszty in sod. (1986) so preučevali katabolizem HCK in ugotovili, da lahko *D. bruxellensis* metabolizira kumarno, ferulno in sinapično kislino, ne more pa katabolizirati kavne, vanilične ali siringične kisline. Nasprotno so za kvasovko *D. anomala* ugotovili, da lahko dekarboksilira kumarno, ferulno in kavno kislino, ne more pa metabolizirati sinapične kisline. Edlin in sod. (1995) trdijo, da je razlog za razlike v metabolizmu HCK med različnimi vrstami *Dekkere* spp. v različnih specifičnostih encimov dekarboksilaz do substratov. V skladu s tem so Harris in sod. (2009) ugotovili, da se aktivnost encima Kkdp

v kvasovki *D. bruxellensis* bistveno močneje inducira s kumarno kislino v primerjavi s ferulno kislino. To pojasnjuje dejstvo, da je *D. bruxellensis* bolj odporna na kumarno kot na ferulno kislino. Nasprotno pa je bil encim Kkdp iz kvasovke *D. anomala* bolj odziven na kavno kislino v primerjavi s ferulno ali kumarno kislino, kar so potrdili tudi Edlin in sod. (1995). Vseeno obstajajo izjeme znotraj vrst *D. bruxellensis* in *D. anomala*. Na primer Harris in sod. (2009) so opazili, da je bil sev *D. bruxellensis* CBS 2336 najbolj odziven na kumarno kislino, sev *D. bruxellensis* AWRI 1499 pa na ferulno kislino. Nadalje so Oelofse in sod. (2009) pokazali, da so se razlike v produkciji hlapnih fenolov med različnimi sevi *D. bruxellensis* povečale, če so v gojišče dodali FK in *p*-KK v kombinacijah. Razlike v produkciji hlapnih fenolov so bile med sevi bistveno manjše, ko je bila v gojišču prisotna le ena vrsta HCK. Zanimivo je tudi opažanje Godoya in sod. (2009), da je prisotnost 98,5 mg/L (0,6 mmol/L) *p*-kumarne kisline pozitivno vplivala na stopnjo rasti nekaterih izolatov kvasovke *D. bruxellensis*. Ker so uporabili podobno koncentracijo *p*-kumarne kisline kot v številnih drugih študijah, kjer podobnega efekta niso zaznali, je najverjetnejše razlog za ta pojav sevno specifična prilagoditev kvasovke *D. bruxellensis* na prisotnost HCK.

#### 2.5.3.3 Vpliv raznolikosti sevov na biosintezo hlapnih fenolov

Godoy in sod. (2009) so testirali intracelularne proteinske ekstrakte 12 izolatov kvasovke *D. bruxellensis* in ugotovili, da jih je večina vsebovala dekarboksilazno aktivnost encima Kkdp, redkeje pa so vsebovali reduktazno aktivnost encima Vprp. Nadalje so Conterno in sod. (2006) ugotovili, da je skoraj polovica izolatov kvasovke *D. bruxellensis* proizvajala velike količine 4-EP in 4-EG, medtem ko je druga polovica proizvedla le do 4 mg/L 4-EP in 4-EG. Detekcija 4-EP in 4-EG se uporablja kot metoda za ugotavljanje prisotnosti kvasovke *Dekkera bruxellensis* v vinu, vendar je potem takem neuporabna za mnoge seve te vrste kvasovke. V primeru da vinarji ne zaznajo sinteze teh komponent, lahko določeni sevi *D. bruxellensis* še vedno uspevajo v tolikšnem številu, da lahko pokvarijo vino z izločanjem nekaterih drugih nezaželenih snovi (na primer ocetne kisline).

Harris in sod. (2009) so opazili, da so sevi, ki so bili izolirani iz vinskih kleti, v katerih je bil kvar vina pogost pojav, vsebovali zelo močno aktivnost encima Kkdp, v primerjavi z ostalimi sevi vrste *D. bruxellensis*. Renouf in sod. (2009) so pokazali, da so taki sevi v primerjavi z laboratorijskimi sevi bolj odporni na visoke koncentracije etanola in SO<sub>2</sub>, na spremembe v pH in so bolje uspevali v grozdni brozgi. Dodatno so opazili, da so vsi sevi, ki so bili izolirani iz pokvarjenih vin, proizvedli dvakrat več 4-EF v primerjavi z 4-EG, medtem ko so laboratorijski sevi običajno proizvedli enake količine obeh etilnih fenolov.

#### 2.5.4 Producija hlapnih fenolov s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*

Za uspešno in popolno alkoholno fermentacijo grozdnega soka je potrebno brozgo inokulirati s komercialno startno kulturo. V ta namen se najpogosteje uporablja vinski sevi kvasovke *S. cerevisiae* in njej sorodne vrste zaradi njihovih številnih dobrih fermentabilnih lastnosti, kot so: hiter anaerobni metabolizem, učinkovita poraba sladkorjev, dobra toleranca na etanol in SO<sub>2</sub> ter produkcije zaželenih aromatskih estrov.

Nekateri hlapni fenoli, kot sta 4-VG in 4-VF, so naravno prisotni v vinih in so pomembni pri tvorbi aromatskega profila vina. Chatonnet in sod. (1993) so preučevali sintezo hlapnih fenolov s kvasovko *S. cerevisiae* in ugotovili, da samo bela vina vsebujejo signifikantne količine vinilfenolov, ki so lahko občasno odgovorni za nastanek fenolnih priokusov. Kvasovka *S. cerevisiae* lahko pretvori kumarno in ferulno kislino do 4-VF in 4-VG, etilnih derivatov pa ni sposobna sintetizirati. Van Wyk in Rogers (2000) sta preučila dekarboskilacijsko sposobnost različnih sevov *S. cerevisiae* v vinih Kerner. Ugotovila sta, da lahko komercialne vinske seve razdelimo v nizke in visoke producente 4-VG. Predlagala sta, da bi lahko seve z nizko stopnjo produkcije uporabili za fermentacijo grozdne brozge, ki vsebuje veliko HCK.

## 2.6 MIKROBNE INTERAKCIJE V MEŠANIH FERMENTACIJAH

Uporaba spontanih ali inokuliranih fermentacij z izbranimi sevi je odprla številne razprave in polemike še posebej glede vpliva kvasovk na organoleptične lastnosti vina. V primeru spontanih fermentacij je lahko vpliv različnih vrst kvasovk na aroma vina nekonsistenten, saj težko nadzorujemo proces fermentacije. Po drugi strani pa starterske kulture kvasovke *S. cerevisiae* po inokulaciji sintetizirajo visoke koncentracije etanola, kar pa inhibira rast *ne-Saccharomyces* kvasovk in posledično zmanjša kompleksnost arome vina. Zaradi tega se raziskave usmerjajo v razvoj izbranih multistarterskih kultur z definiranimi sevi kvasovk in pogoji rasti (Fleet, 2003).

Mikrobne interakcije med vinskimi mikroorganizmi vključujejo nevtralizem, komenzalizem, medsebojno odvisnost/sinergijo, amenzalizem ali antagonizem in konkurenco (Boddy in Wimpenny, 1992; Henick-Kling in sod., 1998; Fleet, 2003). Prevzem hranih snovi, kot so npr. aminokisline in vitamini, s strani enega mikroorganizma, lahko negativno vpliva na rast in razvoj ostale mikrozdržbe. Poleg tega lahko izločeni metaboliti, kot so etanol, inhibitorni peptidi, proteini in glikoproteini, preprečijo rast ali povzročijo razpad celic drugih mikroorganizmov. Primer takih mikroorganizmov so zimocidalni/ubijalski sevi kvasovke *S. cerevisiae*. Za razliko od tega pa lahko nekateri metaboliti, izboljšajo rast preostalih mikroorganizmov. Na primer po procesu avtolize celic se v gojišče sprosti celična vsebina, ki vsebuje aminokisline, minerale in vitamine, ki predstavljajo nov vir hranil v iztrošenem gojišču (Charpentier in sod., 1986; Fleet, 2003).

### 2.6.1 Mešane fermentacije med *S. cerevisiae* in *ne-Saccharomyces* kvasovkami

Številne študije so pokazale, da je mogoče izboljšati aroma ali stabilnost vina z uporabo mešanih kultur *Saccharomyces* in *ne-Saccharomyces* kvasovk. Castelli in sod. (1955) so z uporabo zaporedne inokulacije s kvasovkama *T. delbrueckii* in *S. cerevisiae* zmanjšali vsebnost ocetne kisline v vinu. Nedavno so to domnevno preverili Bely in sod. (2008), pri čemer je prišlo do 60 % znižanja hlapnih kislin in acetaldehyda.

Snow in Gallender (1979) sta za zmanjšanje koncentracije jabolčne kisline v vinu predlagala zaporedno inokulacijo s kvasovkama *Schizosaccharomyces pombe* in *S. cerevisiae*. Silva in sod. (2003) so deacidifikacijo še dodatno izboljšali, in sicer z imobilizacijo celic kvasovke *S. pombe*. Dodatno so Kim in sod. (2008) pokazali, da je v

prisotnosti *S. cerevisiae* tudi kvasovka *Issatchenka orientalis* sposobna razgradnje jabolčne kisline.

Poskusi z mešanimi fermentacijami kultur *H. uvarum*, *T. delbrueckii* in *S. cerevisiae* so pokazali jasne razlike v metabolizmu kvasovke *S. cerevisiae* v mešani in čisti kulti, pri čemer je prišlo do uspešnega povečanja kompleksnosti aromatskega profila vina (Ciani in sod., 2006). Ciani in sod. (2006) so dodatno opazili, da lahko flokulacijski sev *H. uvarum* interagira z ne-flokulativnim sevom *S. cerevisiae* in pri tem inducira ko-flokulacijo obeh sevov skupaj.

Moreira in sod. (2008) so povečali končne koncentracije žveplovih komponent, višjih alkoholov in estrov (etyl acetata), in sicer z inokulacijo multistarterske kulture, ki je vsebovala kvasovke *H. uvarum*, *H. guilliermondii* in *S. cerevisiae*. Ugotovili so, da je kvasovka *H. uvarum* predvsem vplivala na povečanje produkcije izoamil acetata, kvasovka *H. guilliermondii* pa na povečanje produkcije 2-fenil-etyl acetata.

Soden in sod. (2000) so opazili, da imobilizirana kvasovka *Candida stellata* (oz. *Starmerella bombicola*) v kombinaciji s plavajočo kvasovko *S. cerevisiae* tvori večjo količino zaželenega glicerola v vinu. Dodatno so opazili, da je bila izraba sladkorjev bolj učinkovita, če so v gojišče najprej inokulirali kvasovko *C. stellato*. Ta je iz gojišča prevzela samo fruktozo, kasneje dodana *S. cerevisiae* pa je izrabila predvsem glukozo. Kvasovka *C. stellata* ima nizko dehidrogenazno aktivnost in zato tvori velike količine acetaldehida in acetoina v gojišču. Oba metabolita lahko privzame kvasovka *S. cerevisiae*, kar pa posledično vpliva na povečanje aktivnosti njene metabolizma.

Toro in Vazquez (2002) sta opazila povečanje v koncentraciji propanola v mešanih fermentacijah s kvasovkama *Candida cantarellii* in *S. cerevisiae*. Ugotovila sta, da je populacija kvasovke *C. canterellii* hitro odmrla in avtolizirala, pri čemer je prišlo do sprostitev aminokislin v gojišče. Povečana koncentracija aminokislin v gojišču je posledično spodbudila sintezo propanola v kvasovki *S. cerevisiae*.

Garcia in sod. (2002) so z uporabo mešanega inokuluma kvasovk *Debaryomyces vanriji* in *S. cerevisiae* povečali končno koncentracijo geraniola, ki je najpomembnejša terpenoidna komponenta v muškatnem vinu. V mešanih fermentacijah so opazili tudi večjo vsebnost estrov predvsem etil-laktata, dietilsukcinata, etildekanoata, etil- in izopentil-4-hidroksi-butanoata.

Nadalje so Anfang in sod. (2009) ugotovili, da fermentacija s kvasovkama *S. cerevisiae* in *Pichia kluyveri* v razmerju 1:9 vpliva na večjo produkcijo aromatske žveplove spojine 3MHA (3-merkaptoheksil acetata). Podobne rezultate so dobili tudi Clemente-Jimenez in sod. (2005), ko so zaporedno inokulirali kvasovki *Pichia fermentans* in *S. cerevisiae*.

Kurita in sod. (2008) so želeli ugotoviti, kakšen je vpliv kvasovke *Pichia anomala* na metabolizem aromatskih snovi kvasovke *S. cerevisiae*. Odkrili so, da kvasovka *Pichia anomala* v gojišče izloča molekulo etil acetat, tega pa kvasovka *S. cerevisiae* z esterazno aktivnostjo (Eahp) hidrolizira do zaželenega izoamil acetata.

## 2.6.2 Vpliv mikrobnih interakcij med kvasovkama *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae*

Jensen in sod. (2008) so izvedli številne mešane fermentacije v kombinacijah s kvasovko *S. cerevisiae* in drugimi *ne-Saccharomayces* kvasovkami (*D. bruxellensis*, *Candida pararugosa* in *Pichia guilliermondii*). Ugotovili so, da je bila rast kasovke *S. cerevisiae* v prisotnosti kvasovke *D. bruxellensis* nespremenjena v primerjavi s čistimi kulturami in da je v obeh primerih presegala  $10^7$  CFU/mL. Avtorji predvidevajo, da prisotnost kvasovke *D. bruxellensis* ni vplivala na rast kvasovke *S. cerevisiae*. V nasprotju s tem so Silva in sod. (2011) ugotovili, da je aktivnost kvasovke *S. cerevisiae* jasno zatrta v prisotnosti kvasovke *Dekkera custersianus*. Negativni vpliv na rast kvasovke *S. cerevisiae* je bil očiten tako v zgodnji stopnji fermentacije kot tudi v končni količini proizvedenega CO<sub>2</sub>. Poznano je, da *Dekkera* spp. tvori ocetno kislino, etanol in hlapne fenole. Ocetna kislina že v nizkih koncentracijah (2,5 µL/mL) negativno vpliva na presnovne procese v kvasovki *S. cerevisiae*. Nenabita oblika ocetne kisline lahko vstopi v celico s preprosto difuzijo. To lahko vpliva na znižanje znotrajceličnega pH, na izgubo H + protonov (Calahorra in sod., 1987) in na večjo izrabo molekul ATP (Eraso in Gancedo, 1987). Ti procesi so stresni za celice kvasovk in lahko privedejo do sprožitve oksidativnega stresa in posledično do iniciacije apoptoze v celici (Mroczek in Kufel, 2008). Silva in sod. (2011) so testirali tudi vpliv hlapnih fenolov na rast kvasovke *S. cerevisiae*. Pokazali so, da prisotnost 4-etilfenola v koncentraciji 19,61 mg/L ni kazala vpliva na presnovo kvasovke *S. cerevisiae*.

Rast kvasovke *D. bruxellensis* je počasna, vendar konstantno narašča in lahko s časoma doseže koncentracijo  $5 \times 10^9$  CFU/mL (Dias in sod., 2003). Tako velike koncentracije kvasovke *D. bruxellensis* nastopijo šele po zaključku alkoholne fermentacije, ko kvasovka *S. cerevisiae* preide v fazo celičnega odmiranja. Silva in sod. (2011) so opazili, da je kvasovka *Dekkera custersianus* bolj aktivna v mešanih fermentacijah s kvasovko *S. cerevisiae* v primerjavi s čisto kulturo (samo kvasovka *D. custersianus*). Kvasovke vrste *Dekkera* spp. so odvisne od kisika in od stopnje prezračevanja gojišča. Uscanga in sod. (2003) so pokazali, da večje kot je prezračevanje, manjša bo produkcija etanola in večja bo sinteza ocetne kisline. V pogojih anaerobne fermentacije je pojav ocetne kisline v gojišču minimalen. Biosinteza ocetne kisline iz acetaldehida je oksidativni proces, pri čemer se NAD<sup>+</sup> reducira do NADH. Posledično je sinteza ocetne kisline odvisna od koncentracije akceptorjev, ki sprejmejo vodikov elektron. Najpogostejsi akceptorji v kvasovki *Dekkera* spp. so kisik, acetoin, aceton in dihidroksiaceton (Silva in sod., 2011). V anaerobnih pogojih je koncentracija teh akceptorjev omejena in posledično pride do pojava imenovanega »Custerjev efekt« (Scheffers in Wiken, 1969). Custerjev efekt kvasovk je nasproten »Pasteurjevemu efektu« in razлага pojav, ko kisik ali drugi akceptorji vodikovega elektrona spodbudijo fermentacijo kvasovk. V mešanih fermentacijah kvasovka *S. cerevisiae* izloča acetoin in druge akceptorje, te pa z namenom redukcije molekule NAD<sup>+</sup> izrabi kvasovka *D. custersianus*. Potemtakem je v mešanih fermentacijah Custerjev efekt v kvasovki *D. custersianus* manj izrazit v primerjavi s čistimi kulturami te kvasovke, kar posledično vpliva na povečanje njene aktivnosti (Silva in sod., 2011).

Dias in sod. (2003) so preučevali produkcijo 4-EF v mešanih fermentacijah s kvasovkama *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae* v sintetičnem moštu. Za razliko od čistih kultur se je na začetku fermentacije stopnja produkcije 4-VF povečala. Opazili so, da je pretvorba 4-VF v 4-EF s kvasovko *D. bruxellensis* stekla šele, ko je ta dosegla stacionarno fazo rasti.

Rezultati tako iz umetnega kot iz pravega mošta kažejo na to, da je kvasovka *S. cerevisiae* tekom alkoholne fermentacije sintetizirala 4-VF in ga sproščala v okolje. Po alkoholni fermentaciji je nato kvasovka *D. bruxellensis* s časoma pretvorila 4-VF v 4-EF. Glede na ta opažanja so Dias in sod. (2003) sklepali, da sinteza 4-VF s kvasovko *S. cerevisiae* lahko vpliva na produkcijo 4-EF kvasovke *D. bruxellensis*.

Jensen in sod. (2009) so z mešanimi fermentacijami s kvasovko *S. cerevisiae* pokazali, da je bila kvasovka *D. bruxellensis* v primerjavi s kvasovkami *Candida pararugosa* in *Pichia guilliermondii* edina, ki je bila sposobna proizvajati hlapne fenole tako v grozdni brozgi kot v rdečem vinu, pri čemer je biosintetizirala nekaj manj kot 40 mg/L 4-EF in okoli 300 mg/L 4-EG. Nadalje so poskusi v rdečem vinu pokazali, da je bila od vseh obravnavanih vrst kvasovk le kvasovka *D. bruxellensis* sposobna preživeti več kot 40 dni po inokulaciji in doseči rast do  $10^7$  CFU/mL (Jensen in sod., 2009). Nekatere druge kvasovke, ki lahko tvorijo etilfenole, le redko povzročijo kvar vina, saj je njihova rast močno inhibirana v prisotnosti kvasovke *S. cerevisiae*. Na primer kvasovka *P. guilliermondii* raste samo na začetku inkubacije, po končani alkoholni fermentaciji s kvasovko *S. cerevisiae* pa hitro odmre (Sáez in sod., 2010). Odmiranje je najverjetnejše posledica občutljivosti kvasovke *P. guilliermondii* na etanol, saj le ta ni zmožna rasti v gojišču z več kot 8 % alkohola. Kvasovka *P. guilliermondii* lahko potemtakem povzroči kvar vina samo v primeru, ko se alkoholna fermentacija prekine in je rast kvasovke *S. cerevisiae* zakasnjena (ko nastopi tako imenovana »polžja« fermentacija ali počasna fermentacija) (Lopes in sod., 2009).

### 3 MATERIALI IN METODE

V spodnjih poglavjih so predstavljeni vsi postopki in vse metode, ki smo jih uporabili pri laboratorijskem delu. Poleg metod in protokolov so navedeni tudi vsi kemijski kompleti, vse aparature in vse merilne naprave, ki smo jih potrebovali pri delu.

#### 3.1 MATERIALI

Vse eksperimentalne poskuse smo izvedli z uporabo materialov, ki so predstavljeni v naslednjih poglavjih.

##### 3.1.1 Kulture kvasovk *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae*

Za poskuse fermentacij v umetnem moštu smo uporabili naslednje seve kvasovk: *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin EC1118) in *Dekkera bruxellensis* (ZIM 701, ZIM 2306 in ZIM 1762). Vsi zgoraj predstavljeni sevi so bili pridobljeni iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani (preglednica 2). Laboratorijski sev kvasovke *D. bruxellensis* CBS 2499 je bil deponiran od Piškurja in sod. (2012). Sevi kvasovk so bili hranjeni v 15 % glicerolni raztopini na - 80 °C in gojeni na agarnem gojišču YPD pri temperaturi 28 °C.

**Preglednica 2: Izvor sevov kvasovk *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae*.**

Table 2: Strains of yeasts *D. bruxellensis* and *S. cerevisiae* involved in the research, their designation and origin.

Vrsta kvasovke	Oznaka	Izvor
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EC1118	Komercialni sev Lallemand®
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 701	Mošt Rebule, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 2512	Mošt Malvazije, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 700	Mošt Rebule, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 702	Mošt Rebule, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 703	Mošt Rebule, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 704	Mošt Rebule, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 706	Mošt Rebule, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 1764	Mošt Rebule, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 2306	Mošt Malvazije, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ZIM 1762	Mošt Rebule, Slovenija
<i>Dekkera bruxellensis</i>	CBS 2499	Piškur in sod. (2012)

### 3.1.2 Bioreaktorji

Vse fermentacije razen fermentacij, ki so bile uporabljene za analizo z DNA mikromrežami, smo izvedli v 250 mL erlenmajericah. Te so bile zatesnjene z gumijastim zamaškom, ki je bil preboden z dvema iglama za izhajanje CO<sub>2</sub>. Erlenmajerice smo napolnili z 200 mL umetnega mošta MS300 (80 % volumna erlenmajerice). Fermentacija je potekala na magnetnem mešalu v inkubatorju pri temperaturi 22 °C.

### 3.1.3 Membranski bioreaktor

Mešane in kontrolne fermentacije, ki so bile namenjene za analizo z DNA mikromrežami, so bile izvedene v membranskem bioreaktorju, ki je predstavljen na sliki 3. Sistem je zasnovan za preučevanje mešane kulture mikroorganizmov. V bioreaktorju sta kvasovki *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae* ločeni med seboj s polprepustno membrano, tako da lahko substrati in njuni metaboliti prehajajo skozi membrano, kvasovke obeh vrst pa so ločene in rastejo vsaka v svojem predelu. Na ta način lahko ločeno vzorčimo in analiziramo vsako kvasovko posebej znotraj mešane fermentacije. Membranski sistem nam dodatno omogoča, da lahko iz mešanih fermentacij izoliramo celokupno RNA, ki pripada le eni od vrst kvasovk.

Bioreaktor je sestavljen iz dveh kvadratnih polikarbonatnih stekleničk (Nalgene), ki imata v sredini vsaka po eno centralno odprtino. Med odprtinama je vstavljena inertna membrana (premer por: 1,2 µm, celulozno acetatna membrana (MAGNA); GE Waters in Process Technologies), ki je na obe stranah zatesnjena z dvema gumijastima (ploskima) tesnilkama. Sistem je sestavljen tako, da mehanska sila stiska omenjene komponente bioreaktorja, tako da postane membranski sistem neprepusten za vodo in pline. V primeru mešanih fermentacij je bila kvasovka *S. cerevisiae* ES-1118 inokulirana na eni strani membrane, kvasovka *D. bruxellensis* ZIM 701 pa na drugi strani membrane, in sicer obe v koncentraciji 1x10<sup>6</sup> celic/mL. Obe strani bioreaktorja sta vsebovali po 200 mL umetnega mošta MS300. V čistih kulturah smo bodisi *S. cerevisiae* ali *D. bruxellensis* nacepili na eno stran membrane, druga stran pa je ostala neinokulirana in sterilna do konca fermentacije. Obe strani bioreaktorja smo zatesnili z gumijastim zamaškom, ki je bil preboden z dvema iglama za izhajanje CO<sub>2</sub>. Nadalje sta obe strani bioreaktorja vsebovali magnetno mešalo, ki je omogočalo kontinuirno mešanje biomase.

### 3.1.4 Mikrobiološka gojišča

Za kultivacijo na ploščah in štetje kolonij na ploščah smo uporabili standardno YPD gojišče z dodanim agarjem. Za pripravo starter kultur (inokulumov) za fermentacije smo uporabili tekoče YPD gojišče. V primeru mešanih fermentacij smo za štetje kolonij na ploščah uporabili diferencialno gojišče.

#### 3.1.4.1 Standardna gojišča

Sestava tekočega gojišča YPD (ang. Yeast Peptone Dextrose) je podana v preglednici 3 (Raspor in Smole Možina, 1993).

**Preglednica 3: Tekoče gojišče YPD za pripravo starter kultur (Raspor in Smole Možina, 1993).**

Table 3: Composition of liquid YPD media for starter culture preparation (Raspor and Smole Možina, 1993).

Sestavine	Masa na 500 mL dH <sub>2</sub> O	Končna koncentracija
Glukoza (Merck)	10 g	2 %
Pepton (Biolife)	10 g	2 %
Kvasni ekstrakt (Biolife)	5 g	1 %
dH <sub>2</sub> O	Do končnega volumna 500 mL	

Vse kemikalije za gojišče smo natehtali v litrsko steklenico z modrim navojem in jih raztopili v 500 mL destilirane vode. Gojišče je bilo sterilizirano v avtoklavu za 20 min pri 121 °C in 1,1 barih. Sterilno gojišče smo v brezprašni komori vlili v 250 mL erlenmajerice in vanje nacepili kulture kvasovk. Steklenice smo zamašili s sterilnimi penastimi zamaški za aerobno inkubacijo. Starterske kulture smo inkubirali na stresalnikih pri 28 °C. Sestava trdnega gojišča YPD je podana v preglednici 4 (Atlas, 2004).

**Preglednica 4: Sestava trdnega gojišča YPD (Atlas, 2004).**

Table 4: Composition of solid YPD media (Atlas, 2004).

Sestavine	Masa na 500 mL dH <sub>2</sub> O	Končna koncentracija
Kvasni ekstrakt (Biolife)	5 g	1 %
Agar (Biolife)	10 g	2 %
Glukoza (Merck)	10 g	2 %
Pepton (Biolife)	10 g	2 %
dH <sub>2</sub> O	do 500 mL	

Tehtanje in sterilizacija gojišča sta enaki kot pri tekočem gojišču z izjemo dodajanja 10 g agarja v gojišče. Po sterilizaciji smo gojišče ohladili s konstantnim in monotonim mešanjem pod curkom hladne vode (mešanje ne sme biti premočno zaradi nevarnosti nastanka mehurčkov) in ga vlili v petrijeve plošče v brezprašni komori pod aseptičnimi pogoji dela.

### 3.1.4.2 Diferencialno gojišče

Diferencialno gojišče smo uporabili v primeru štetja kolonij kvasovke *D. bruxellensis* v mešanih fermentacijah s kvasovko *S. cerevisiae*. V trdno gojišče YPD smo vnesli 0,01 % cikloheksamid (preglednica 5). V prisotnosti cikloheksamida, je rast kvasovke *S. cerevisiae* onemogočena, na rast *D. bruxellensis* pa antibiotik nima vpliva (Ueno in sod., 2001).

**Preglednica 5: Diferencialno gojišče za štetje kolonij kvasovk *D. bruxellensis* na ploščah tekom večvrstne fermentacije skupaj s kvasovko *S. cerevisiae* (Ueno in sod., 2001).**

Table 5: Differential medium for the enumeration of colonies of yeast *D. bruxellensis* during mixed culture fermentations with *S. cerevisiae* (Ueno et al., 2001).

Sestavine	Masa na 500 mL dH <sub>2</sub> O	Končna koncentracija
Pepton (Biolife)	10 g	2 %
Glukoza (Merck)	10 g	2 %
Kvasni ekstrakt (Biolife)	5 g	1 %
Cikloheksimid (Sigma- Aldrich)	0,05 g	0,01 %
Agar (Biolife)	10 g	2 %
dH <sub>2</sub> O	do 500 mL	

Tehtanje in sterilizacija gojišča sta enaki kot pri trdnem gojišču YPD z izjemo dodajanja 10 g agarja in cikloheksamida v gojišče. Pri tem pazimo, da cikloheksamid dodamo šele po temperaturni sterilizaciji gojišča.

### 3.1.4.3 Umetni mošt

Večina poskusov fermentacij je bila izvedena v sintetičnem ali umetnem moštu imenovanem MS300 (Bely in sod., 1990), ki je vseboval 100 g/L glukoze in 100 g/L fruktoze. Sintetični mošt MS300 po svoji kemijski sestavi posnema pravi grozdni mošt in vsebuje vse elemente, ki jih kvasovke potrebujejo tekom rasti in vinske fermentacije. Podrobnejša sestava je navedena v preglednici 6. Glukozo in fruktozo smo zatehtali direktno v gojišče, za mineralne soli, vitamine in aminokisline pa smo pripravili založne raztopine. Po pripravi in meritvi pH vrednosti na 3,3, smo celotni umetni mošt filtrirali skozi membrano z 0,2 µm porami.

Za pripravo založne raztopine makroelementov smo natehtali vse sestavine v preglednici 6, jih raztopili v 900 mL dH<sub>2</sub>O in volumen dokončno umerili na 1 liter v 1000 mL bučki. V založno raztopino makroelementov smo dodali tudi amonijev klorid. Raztopina je bila filtrirana in shranjena pri temperaturi 4 °C.

**Preglednica 6: Makroelementi v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990).**

Table 6: Macroelements composition in synthetic must MS300 (Bely et al., 1990).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (mg/L)	Koncentracija 10-kratne založne raztopine (g/L)
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Sigma)	250	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	750	7,5
NaCl	200	2
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Merck)	155	1,55
Amonijev klorid (Sigma)	300	3

100-krat koncentrirano založno raztopino mikroelementov smo pripravili po opisu priprave založne raztopine makroelementov v preglednici 7.

**Preglednica 7: Mikroelementi v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990).**  
Table 7: Microelements composition in synthetic must MS300 (Bely et al., 1990).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (mg/L)	Koncentracija 100-kratne založne raztopine (g/L)
ZnSO <sub>4</sub>	4	0,4
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	4	0,4
KI	1	0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1	0,1
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	1	0,1
NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1	0,1
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,4	0,04

100-kratno raztopino vitaminov smo pripravili na enak način kot raztopino makroelementov (preglednica 8). Končni volumen je bil razdeljen v 50 mL falkonke in shranjen v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C.

**Preglednica 8: Vitamini v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990).**  
Table 8: Vitamin composition in synthetic must MS300 (Bely et al., 1990).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (mg/L)	Koncentracija 100-kratne založne raztopine (g/L)
Mio-inozitol (Sigma)	20	2
Tiamin HCl (Sigma)	0,25	0,025
Nikotinska kislina (Sigma)	2	0,2
Piridoksin HCl (Sigma)	0,25	0,025
Kalcijev pantotenat (Fluka)	1,5	0,15
Biotin (Fluka)	0,003	0,0003

23-kratno raztopino aminokislin smo zopet pripravili na enak način kot raztopino makroelementov. Tudi v primeru raztopine aminokislin smo volumen razdelili v 50 mL falkonke in shranili v zamrzovalnik pri temperaturi -20 °C (preglednica 9).

**Preglednica 9: Aminokisline v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990).**

Table 9: Aminoacid composition in synthetic must MS300 (Bely et al., 1990).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (mg/L)	Koncentracija 23-kratne založne raztopine (g/L)
L-arginin (Sigma)	374,4	8,6
L-triptofan (Sigma)	179,3	4,1
L-alalan (Merck)	145,3	3,3
L-glutaminska kislina (Sigma)	120,4	2,8
L-prolin (Sigma)	612,6	14,1
L-glutamin (Merck)	505,3	11,6
L-izolevcin (Merck)	32,7	0,8
L-histidin (Sigma)	32,7	0,8
L-metionin (Sigma)	31,4	0,7
L-tirozin (Sigma)	18,3	0,4
L-serin (Sigma)	78,5	1,8
L-treonin (Sigma)	759,2	17,5
L-fenilalanin (Sigma)	37,9	0,9
L-levcin (Sigma)	48,4	1,1
L-aspartinska kislina (Sigma)	44,5	1,0
L-valin (Sigma)	44,4	1,0
L-lizin (Sigma)	17,0	0,4
L-glicin (Sigma)	18,3	0,4
L-cistein (Sigma)	13,1	0,3

Založno raztopino ergosterola smo pripravili tako, da smo 0,2 g ergosterola raztopili v 22 mL Tween 80 (Sigma) in 30 mL absolutnega etanola (Merck) (preglednica 10). Preostali postopek je potekal na enak način kot pri pripravi založne raztopine makroelementov. Založno raztopino ergosterola smo razdelili v dvomililitrske mikrocentrifugirke in jo shranili v zamrzovalnik pri temperaturi -20 °C.

**Preglednica 10: Koncentracija ergosterola v sintetičnem moštu MS300 (Bely in sod., 1990).**

Table 10: Ergosterol concentration in synthetic must MS300 (Bely et al., 1990).

Sestavina	Koncentracija v gojišču (mg/L)	Koncentracija založnih raztopin (g/L)
Ergosterol (Sigma)	3,7	3,8

Volumni prenosa založnih raztopin za 1 L sintetičnega mošta MS300 so navedeni v preglednici 11. Vse volumne založnih raztopin smo umerili v merilnih valjih in jih vnesli v stekleno čašo. Po dodatku sladkorjev smo skupno raztopino dobro premešali in jo filtrirali. Umetni mošt smo kratkoročno hranili pri temperaturi 4 °C.

**Preglednica 11: Volumni prenosa založnih raztopin za pripravo 1L mošta MS300 (Bely in sod., 1990).**  
Table 11: Stock solution volumes for preparation of 1 L of synthetic must MS300 (Bely et al., 1990).

Sestavine	Založne raztopine	Volumen
Mikroelementi	100x	10 mL
Aminokisline	23x	43,45 mL
Makroelementi	10x	100 mL
Ergosterol (Sigma)	1000x	130 µL
Vitamini	100x	10 mL
dH <sub>2</sub> O		1000 mL

### 3.1.5 Reagenti in raztopine

Reagenti in raztopine, ki smo jih uporabili pri analiznih, kemometričnih in molekularnih metodah, so navedene v naslednjih podpoglavljih.

#### 3.1.5.1 Reagenti za izolacijo DNA

Genomsko DNA smo izolirali z uporabo kompleta MasterPure Yeast DNA purification (Epicentre Biotechnologies), in sicer po navodilih proizvajalca.

Komplet vsebuje:

- Raztopino za liziranje celic kvasovk (60 mL)
- MPC reagent za precipitacijo proteinov (50 mL)
- RNaza A (5 µg/µL 200 µL)
- TE pufer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA) (7 mL)

#### 3.1.5.2 Reagenti za izolacijo RNA

Vso steklovino za delo pri izolaciji RNA smo pomili z detergentom, jo temeljito sprali z navadno in destilirano vodo in nato še z DEPC vodo (dietil pirokarbonatom) (Sigma) in jo pekli v peči vsaj 12 h na 180 °C.

Vodo obdelano z DEPC v koncentraciji 0,1 % smo pripravili v pečenih steklenicah, ki smo jih 3 x sprali z bidestilirano (HPLC) vodo. Vanje smo nalili HPLC vodo do zadnje oznake in ji dodali DEPC do končne koncentracije 0,1 %. Pokrito steklenico smo močno mešali 1 min in jo inkubirali čez noč pri 37 °C (oziora vsaj 12 h). DEPC vodo smo nazadnje avtoklavirali in jo ohladili na sobno temperaturo. Delo je potekalo v brezprašni komori pod strogimi pogoji dela z RNA.

- 75 % etanol (v/v) smo pripravili tako, da smo 37,5 mL absolutnega etanola (Merck) zmešali z 12,5 mL DEPC vode
- TRIzol® Reagent (Ambion®). Reagent smo hranili pri temperaturi 4 °C
- SUPERase•In™ RNase Inhibitor (20 U/µL) (Ambion®). Reagent smo hranili pri temperaturi - 20 °C.
- 99,8 % kloroform (brez dodatka izoamil alkohola)
- 99,8 % izopropanol
- Steklene kroglice, sprane s kislino (425-600 µm v premeru (Sigma))

- Tekoči dušik

### 3.1.5.3 Reagenti in raztopine za preverjanje RNA na gelu

- GeneRuler™ DNA ladder mešanica, 100-10000 bp (Molekulski označevalec dolžin DNA fragmentov) (Fermentas)
- Agaroza (Sigma)
- Natrijev dodecil sulfat (SDS) (Sigma) smo pripravili 0,5 % raztopini. V 200 mL smo z valjem prenesli 10 mL bidestilirane vode (ne DEPC vode!)
- 0,5x (v/v) TAE pufer, ki smo ga pripravili iz 50x založne raztopine (Preglednica 12)
- DEPC voda
- SYBR safe DNA barvilo (Invitrogen)
- 2x RNA nanašalni pufer (Fermentas)

**Preglednica 12: Priprava 50x TAE pufra**

Table 12: Composition of 50x TAE buffer.

Sestavina	Količina
Ocetna kislina (Merck)	57,1 mL
Tris baza (Merck)	242 g
Na <sub>2</sub> EDTA (Kemika)	37,2 g
DEPC voda	1000 mL

### 3.1.6 Začetni oligonukleotidi

Začetne oligonukleotide (začetne in končne) smo konstruirali s pomočjo programa Primer 3 (Rozen in Skaletsky, 2000). Uporabili smo jih za metodo PCR pomnoževanja v realnem času (PCR-RČ). Vsi konstruirani začetni oligonukleotidi so predstavljeni v preglednicah 13, 14, 15 in 16.

**Preglednica 13: Začetni oligonukleotidi kvasovke *S. cerevisiae* za hišne gene, uporabljene pri metodi PCR-RČ.**

Table 13: Oligonucleotide primers for housekeeping genes of yeast *S. cerevisiae*, used for real time PCR analysis.

Dostopna koda	Gen	Ime	Tm (°C)	Nukleotidno zaporedje (5'-3')
NM_001179927.1	ACT1	ACT1 <sub>FSC</sub>	58,9	CAGGTATTGCCGAAAGAATG
		ACT1 <sub>RSC</sub>	58,1	GTCAAAGAACCAAGATAGAACCC
emb Z75578.1	18S rRNA	18S RRNA <sub>FSC</sub>	58,4	CTGCTTAATTGCGATAACGAAC
		18S RRNA <sub>RSC</sub>	59,4	CAGACCTGTTATTGCCTCAAAC
NM_001184177.1	TEF1	TEF1 <sub>FSC</sub>	59,4	TGTCACACTGCTCACATTGC
		TEF1 <sub>RSC</sub>	59,7	GGAACGAACTTGACCAAAGC

**Preglednica 14: Začetni oligonukleotidi kvasovke *D. bruxellensis* za hišne gene, uporabljeni pri metodi PCR-RČ.**

Table 14: Oligonucleotide primers for housekeeping genes of yeast *D. bruxellensis*, used for real time PCR analysis.

Dostopna koda	Gen	Ime	Tm (°C)	Nukleotidno zaporedje (5'-3')
gb EI020428.1	ACTI	<i>ACTI</i> <sub>F<sub>db</sub></sub>	59,1	CGGTTCTGGTATGTGCAAAG
		<i>ACTI</i> <sub>R<sub>db</sub></sub>	58,7	TTGACCCATACCGACCATAA
emb X83814.1	18S rRNA	<i>18S rRNA</i> <sub>F<sub>db</sub></sub>	59,9	CAAGCCGAAGGAAGTTGAG
		<i>18S rRNA</i> <sub>R<sub>db</sub></sub>	59,9	GTACAAAGGGCAGGGACGTA
gb EU014766.1	TEF1	<i>TEF1</i> <sub>F<sub>db</sub></sub>	59,9	GACTGCCACACTGCTCACAT
		<i>TEF1</i> <sub>R<sub>db</sub></sub>	58,7	AGCAGCATCACCTCTCTGA

**Preglednica 15: Začetni oligonukleotidi kvasovke *S. cerevisiae* za tarčne gene, uporabljeni pri metodi PCR-RČ.**

Table 15: Oligonucleotide primers target genes of yeast *S. cerevisiae*, used for real time PCR analysis.

Dostopna koda	Gen	Ime	Tm (°C)	Nukleotidno zaporedje (5'-3')
NM_001180846.1	PAD1	<i>PAD1</i> <sub>F<sub>sc</sub></sub>	60,1	CTTTATGCAGGGCAGGTGTT
		<i>PAD1</i> <sub>R<sub>sc</sub></sub>	59,9	GGATCCTGCCAACACTTTGT
NM_001180847.1	FDC1	<i>FDC1</i> <sub>F<sub>sc</sub></sub>	59,9	TTCCTGCAACGAGTGAGATG
		<i>FDC1</i> <sub>R<sub>sc</sub></sub>	60,7	GGATGACCTTGGCTTTGAA

**Preglednica 16: Začetni oligonukleotidi kvasovke *D. bruxellensis* za tarčne gene, uporabljeni pri metodi PCR-RČ.**

Table 16: Oligonucleotide primers target genes of yeast *D. bruxellensis*, used for real time PCR analysis.

Dostopna koda	Gen	Ime	Tm (°C)	Nukleotidno zaporedje (5'-3')
Prepisano iz peptidne sekvence proteina Kkdp (Harris in sod., 2009)	KKD	<i>KKD</i> <sub>F<sub>db</sub></sub>	58,2	TCTCCAAGCAGGGATTG
		<i>KKD</i> <sub>R<sub>db</sub></sub>	59,6	CATTCCGCCTCCACTTTATC
Prepisano iz peptidne sekvence proteina Vprp (Tchobanov in sod., 2008)	VPR	<i>VPR</i> <sub>F<sub>db</sub></sub>	57,6	GGCTTTTGACCATCCAGTA
		<i>VPR</i> <sub>R<sub>db</sub></sub>	58,9	AAGTGAAGTCAATCCTAGGCAAG

**3.1.7 Reagenti za obratni prepis celokupne molekule RNA v molekulo cDNA**

Za obratni prepis v molekulo cDNA smo uporabili komplet SuperScript ® VILO cDNA synthesis (Invitrogen). Komplet je sestavljen iz 5x VILO reakcijske mešanice in 10x SuperScript encimske mešanice (preglednica 17).

**Preglednica 17: Komplet SuperScript ® VILO cDNA synthesis za obratni prepis v molekulo cDNA.**

Table 17: SuperScript ® VILO cDNA synthesis reagents for reverse transcription to cDNA.

Sestavina	Volumen (µL)
10x SuperScript encimska mešanica	1
5x VILO reakcijska mešanica	2
DEPC voda	do 10

### 3.1.8 Reagenti za pripravo reakcijske mešanice PCR v realnem času

Komplet Express SYBR® GreenER™ qPCR Supermix Universal, (Invitrogen), ki je sestavljen iz mešanice SYBR® GreenER™ qPCR Universal in internega barvila ROX.

### 3.1.9 Mikromreže

Kvaliteta celokupne RNA je bila potrjena z aparaturo Agilent Bioanalyzer 2100. Za transkriptomsko analizo izražanja genoma kvasovke *S. cerevisiae* v mešanih in kontrolnih fermentacijah s kvasovko *D. bruxellensis* smo uporabili naslednje DNA mikromreže: Agilent Yeast (V2) Gene Expression microarrays (p/n G4813A-016322).

Reagenti za hibridizacijo so bili vključeni v komplet Agilent Quick Amp (p/n 5190-0442). Komplet je bil sestavljen iz naslednjih podkompletov:

Komplet Low Input Quick Amp Labeling, One-Color (Agilent p/n 5190-2305)  
Ta je sestavljen iz:

- T7 oligonukleotidov, 24 µL
- 5x pufra za prvo verigo, 100 µL
- 0,1M DTT, 70 µL
- 10 mM mešanice dNTP, 20 µL
- Mešanice AffinityScript RNase Block, 36 µL
- 5x Transkripcijskega pufra, 160 µL
- Mešanice NTP, 35 µL
- T7 RNA Polimeraze, 10 µL
- DEPC vode, 250 µL
- Barvila: Cy3-CTP

Ta podkomplet je namenjen sintezi fluorescentno označene cRNA (komplementarna RNA molekuli). Podkomplet nam omogoča delo z 200 ng do 1 µg celokupne RNA. Komplet vsebuje T7 RNA polimerazo, ki istočasno pomnožuje tarčni material, ki je ekvivalenten eksonom, in obenem vključuje fluorescenčno označen nukleotid Cy3-CTP.

Komplet RNA Spike-In, One-Color (Agilent p/n 5188-5282)  
Ta je sestavljen iz:

- Mešanice Spike, 10 µL
- Redčitvenega pufra, 1,2 mL

Poskusi genske ekspresije z DNA mikromrežami so večstopenjski proces, kjer že majhne razlike v vzorcih, postopkih, ali v uporabnikih lahko močno vplivajo na končne rezultate po lasarskem odčitanju mikromrež. Komplet Agilent One Color RNA Spike-In vsebuje pozitivne kontrole, ki omogočajo standardizirano spremljanje genske ekspresije na DNA mikromrežah, in sicer od pomnoževanja in označevanja RNA vzorcev do procesiranja podatkov iz DNA mikromrež.

Komplet je sestavljen iz niza desetih pozitivnih kontrolnih transkriptov, ki so narejeni tako, da se vežejo s komplementarnimi probami na DNA mikromrežah. Kontrolni transkripti niso komplementarni s sekvencami, ki jih najdemo pri večini bioloških vzorcev.

Komplet Gene Expression Hybridization (Agilent p/n 5188-5242)

Ta je sestavljen iz:

- 2x Hi-VRT hibridizacijskega pufra, 2,5 mL (2 viali, 1,25 mL/vialo)
- 25x Fragmentacijskega pufra, 100 µL
- 10x pufer Gene Expression Blocking Agent

Komplet vsebuje popolno in potrjeno hibridizacijsko mešanico za proces hibridizacije vzorcev na DNA mikromreže. Fragmentacijski pufer vsebuje komponente, ki cepijo molekule cRNA do fragmentov, ki so optimalnih dolžin za hibridizacijo na DNA mikromreže. 10X »Blocking Agent« je pufer, ki zmanjšuje nespecifično vezavo med vzorčnimi cRNA molekulami in sondami vezanimi na DNA mikromrežo.

Komplet Gene Expression Wash Buffer (Agilent p/n 5188-5327)

Sestavljen je iz:

- Pufra za spiranje 1,4 L
- Pufra za spiranje 2,4 L
- Triton X-102 (10 %), 6 vial, 1,35 mL/vialo

Komplet omogoča zanesljivo in konsistentno post-hibridizacijsko obdelavo velikega števila stekelc z DNA mikromrežami. Oblikovan je tako, da omogoča odstranitev okoljskih onesnaževalcev, ki jih pogosto najdemo v običajnih puferskih raztopinah. Detergent Triton X-102 omogoča zmanjšanje možnosti za pojav artifaktov, ki lahko nastanejo pri spiranju stekelc, ki vsebujejo DNA mikromreže.

Koncentracija celokupne RNA je bila standardizirana z enobarvnimi RNA sondami različnih koncentracij. Spiranje Cy3 fluorescenčno označenih molekul cRNA smo izvedli skozi kolone RNeasy mini spin (QIAGEN, Valencia, CA). Z NanoDrop ND-1000 Spektrofotometrom (NanoDrop Technologies, Inc.) smo preverili vključitev fluorescenčnega barvila Cy3 v cRNA molekulo in koncentracijo cRNA molekule. Po hibridizaciji smo DNA mikromreže fotografirali s čitalcem G2505B Microarray (Agilent Technologies).

### **3.1.10 Oprema za prepis v cDNA, cRNA in za hibridizacijo na DNA mikromreže**

- Hibridizacijska komora iz nerjavečega jekla (Agilent p/n G2534A)
- Tesnilni vstavki za komoro za stekelce, ki vsebuje 8 DNA mikromrež (Agilent p/n G2534-60003)
- Hibridizacijska pečica naravnana na temperaturo 65 °C (Agilent p/n G2545A)
- Rotacijska naprava v hibridizacijski pečici namenjena za Agilentove hibridizacijske komore (Agilent p/n G2530-60029)
- Mikrocentrifugirke "Nuclease-free" 1,5 mL (Ambion p/n 12400)
- Magnetno mešalo (Corning p/n 401435)

- Krožnik za barvanje stekelc z DNA mikromrežami s stojalom za stekelca (Thermo Shandon p/n 121)
- Rotirajoča vodna kopel ali termoblok naravn na 37 °C, 65 °C, 80 °C, 40 °C, 70 °C in 60 °C
- Čiste klešče
- Pladenj za led
- Pipetni nastavki s filtrsko pregrado “nuclease-free”.

### **3.1.11 Kemikalije za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti**

#### **3.1.11.1 Mobilna faza za določanje hlapnih fenolov**

Koncentracijo hlapnih fenolov smo določali na koloni Waters (130Å; 3,5 µm; 4,6 mm X 150 mm; 1/pkg) pri čemer smo uporabili 27 % acetonitril (Sigma) kot mobilno fazo. Pri tem smo 270 mL acetonitrila vlili v 1000 mL bučko in vanjo dodali ddH<sub>2</sub>O do začrtane oznake. Pred uporabo smo mobilno fazo 20 min razplinjevali v ultrazvočni kopeli.

#### **3.1.11.2 Mobilna faza za določanje sladkorjev in alkoholov**

Glukozo, fruktozo, etanol in glicerol smo določili na ionsko izmenjevalni koloni Aminex HPX – 87H (360 mm × 7,8 mm; BioRad), za mobilno fazo pa smo uporabili 2,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Mobilno fazo smo pripravili v 2000 mL merilni bučki, v katero smo dodali 534 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O do začrtane oznake. Pred uporabo smo mobilno fazo 20 min razplinjevali v ultrazvočni kopeli.

#### **3.1.11.3 Standardne raztopine za pripravo umeritvene krivulje**

Natančna koncentracija glukoze (Sigma), fruktoze (Sigma), etanola (Sigma), glicerola (Sigma) in hlapnih fenolov (Sigma) je bila določena iz umeritvenih krivulj.

##### **3.1.11.3.1 Umeritvena krivulja za glukozo in fruktozo**

Priprava umeritvene krivulje: 1 g glukoze ali fruktoze smo vnesli v 10 mL merilno bučko in vanjo dodali ddH<sub>2</sub>O do začrtane oznake (priprava založne raztopine v koncentraciji 100 g/L). Raztopino smo nato filtrirali čez 0,2 µm filter in iz nje pripravili naslednje koncentracije glukoze ali fruktoze: 10, 20, 30, 40 in 50 g/L (preglednica 18). Umeritveni krivulji sta predstavljeni v prilogah A1 in A2.

**Preglednica 18: Redčenje glukoze ali fruktoze za izdelavo umeritvene krivulje.**  
Table 18: Glucose and fructose dilutions for standard curve determination.

Koncentracija	100 g/L	
[g/L]	V ( $\mu$ L)	V $H_2O$ ( $\mu$ L)
10	100	900
20	200	800
30	300	700
40	400	600
50	500	500

### 3.1.11.3.2 Umeritvena krivulja za etanol

Priprava umeritvene krivulje: 2,535 mL absolutnega etanola smo vnesli v 10 mL merilno bučko, v katero smo dodatno vlili dd $H_2O$  do začrtane oznake (priprava založne raztopine v koncentraciji 200 g/L). Iz raztopine smo pripravili naslednje koncentracije etanola: 10, 20, 30, 40 in 50 g/L (preglednica 19). Umeritvena krivulja je predstavljena v prilogi A3.

**Preglednica 19: Redčenje etanola za izdelavo umeritvene krivulje.**  
Table 19: Ethanol dilutions for standard curve determination.

Koncentracija	200 g/L	
[g/L]	V ( $\mu$ L)	V $H_2O$ ( $\mu$ L)
10	50	950
20	100	900
30	150	850
40	200	800
50	250	750

### 3.1.11.3.3 Umeritvena krivulja za glicerol

Priprava umeritvene krivulje: 0,78 mL glicerola smo vnesli v 20 mL merilno bučko, v katero smo dodatno vlili dd $H_2O$  do začrtane oznake (priprava založne raztopine v koncentraciji 50 g/L). Iz raztopine smo pripravili naslednje koncentracije glicerola: 6, 15, 24, 33 in 42 g/L (preglednica 20). Umeritvena krivulja je predstavljena v prilogi A4.

**Preglednica 20: Redčenje glicerola za izdelavo umeritvene krivulje.**  
Table 20: Glycerol dilutions for standard curve determination.

Koncentracija	50 g/L	
[g/L]	V ( $\mu$ L)	V $H_2O$ ( $\mu$ L)
6	120	880
15	300	700
24	480	520
33	660	340
42	840	160

### 3.1.11.3.4 Umeritvena krivulja za 4-etilfenol

Priprava umeritvene krivulje: 1 g 4-etilfenola smo raztopili v 14 mL absolutnega etanola (priprava založne raztopine v koncentraciji 7,14 g/L). Raztopino smo nato 2000x redčili z absolutnim etanolom do koncentracije 35,7 mg/L. Iz te raztopine smo nato pripravili naslednje koncentracije 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5 in 10 mg/L. Koncentracijo 10 mg/L smo pripravili z mešanjem 0,71 mL ddH<sub>2</sub>O in 0,28 mL raztopine 4-etilfenola s koncentracijo 35,7 mg/L. Ostale koncentracije smo pripravili s polovičnim mešanjem predhodne koncentracije. Na primer koncentracijo 5 mg/L smo pripravili z mešanjem 500 µL ddH<sub>2</sub>O in 500 µL raztopine 4-etilfenola s koncentracijo 10 mg/L (Preglednica 21). Umeritvena krivulja je predstavljena v prilogi A5.

**Preglednica 21: Redčenje 4-etilfenola za izdelavo umeritvene krivulje.**

Table 21: 4-ethylphenol dilutions for standard curve determination.

Koncentracija (mg/L)	V odvzema (µL)	V ddH <sub>2</sub> O (µL)
10	280 (iz 35,7 mg/L)	710
5	500 (iz 10 mg/L)	500
2,5	500 (iz 5 mg/L)	500
1,25	500 (iz 2,5 mg/L)	500
0,62	500 (iz 1,25 mg/L)	500
0,31	500 (iz 0,62 mg/L)	500
0,15	500 (iz 0,31 mg/L)	500

### 3.1.11.3.5 Umeritvena krivulja za 4-etilgvajakol

Priprava umeritvene krivulje: ker je gostota 4-etilgvajakola 1,058 g/L, smo predpostavili, da je 1 mL 99,8 % 4-etilgvajakola približno enak enemu gramu 4-etilgvajakola. Potemtakem smo 1 g 4-etilgvajakola raztopili v 14 mL absolutnega etanola (priprava založne raztopine v koncentraciji 7,14 g/L). Raztopino smo nato 2000x redčili z absolutnim etanolom do koncentracije 35,7 mg/L. Iz te raztopine smo nato pripravili naslednje koncentracije 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5 in 10 mg/L. Naštete koncentracije smo pripravili na enak način kot pri 4-etilfenolu (Preglednica 21). Umeritvena krivulja je predstavljena v prilogi A6.

### 3.1.11.3.6 Umeritvena krivulja za 4-vinilfenol

Priprava umeritvene krivulje: Za pripravo smo odpipetirali 2,14 mL 10 % (masni delež) raztopine 4-vinilfenola v propilen glikolu in jo zmešali z 857 µL absolutnega etanola (priprava založne raztopine v koncentraciji 7,14 g/L). Pri računanju nismo upoštevali gostote 4-vinilfenola (1,055 g/L), saj je ta podobna gostoti vode. Raztopino smo nato 2000x redčili z absolutnim etanolom do koncentracije 35,7 mg/L. Iz te raztopine smo nato pripravili naslednje koncentracije 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5; 5 in 10 mg/L. Naštete

koncentracije smo pripravili na enak način kot pri 4-etilfenolu (Preglednica 21). Umeritvena krivulja je predstavljena v prilogi A7.

### 3.1.11.3.7 Umeritvena krivulja za 4-vinilgvajakol

Priprava umeritvene krivulje: ker je gostota 4-vinilgvajakola 1,011 g/L, smo predpostavili, da je 1 mL 99,8 % 4-vinilgvajakola približno enak enemu gramu 4-vinilgvajakola. Potem takem smo 1 g 4-vinilgvajakola raztopili v 14 mL absolutnega etanola (priprava založne raztopine v koncentraciji 7,14 g/L). Raztopino smo nato 2000x redčili z absolutnim etanolom do koncentracije 35,7 mg/L. Iz te raztopine smo nato pripravili naslednje koncentracije 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 in 5. Naštete koncentracije smo pripravili na enak način kot pri 4-etilfenolu (Preglednica 21). Umeritvena krivulja je predstavljena v prilogi A8.

## 3.1.12 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)

Aromatske snovi smo kvantificirali z metodo GC-MS. Za kvantifikacijo smo uporabili inertni standard 4-metil-2-pentanol v končni koncentraciji 0,1 g/L z dodanim natrijevim kloridom (1,75 g/L).

Koncentriranje aromatskih snovi smo izvedli z mikroekstrakcijo na trdni podlagi (SPME), in sicer z uporabo divinilbenzen/karboksen/polidimetilsilosanskih vlaken (Stable Flex DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm 50/30 µm; Supelco). Nadalje smo uporabili 20 mL steklene viale Varian, v katere smo vnesli vlakna z ekstrahiranimi aromatskimi snovmi. Viale so vsebovale magnetne pokrovčke z navojem in so bile po dimenzijsah kompatibilne z robotskim avtozorčnikom.

Ločevanje in kvantifikacija aromatskih snovi sta potekali na kapilarni koloni Zebron ZB-FFAP (dolžina 30 m, 0,25 mm I.D., debelina filma 0,25 µm), ki je bila povezana s plinskim kromatografskim sistemom Thermo-Finnigan Trace-GC. Ta je bil sestavljen iz enognega Quadrupole Trace-DSQ masno selektivnega detektorja (Thermo Electron Corporation, Austin, Texas - USA) in robotskega avtozorčnika COMBI-PAL (CTC analytics, Zwingen – Switzerland).

## 3.1.13 Pufri

### 3.1.13.1 Fosfatni pufer

Za štetje kolonij na ploščah je bilo potrebno redčiti vzorce celičnih suspenzij kvasovk. To smo naredili z redčitveno vrsto po Kochu, kjer smo celično suspenzijo redčili v fosfatnem pufru PBS (preglednica 22).

**Preglednica 22: Sestava fosfatnega pufra PBS.**

Table 22: Composition of PBS buffer.

<b>Soli</b>	<b>10-kratna založna raztopina</b>
NaCl (Merck)	80 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (Merck)	7,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck)	2,4 g
KCl (Merck)	2 g
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

10-kratno založno raztopino smo pripravili tako, da smo raztopili vse soli pufra, umerili pH vrednost na 7,4 in z dH<sub>2</sub>O dopolnili volumen do 1 litra v stekleni enolitrski merilni bučki. 10x založno raztopino pufra smo avtoklavirali (121 °C, 20 min, 1,1 bar) in jo po ohladitvi hranili pri sobni temperaturi. Če smo žeeli iz založne raztopine pripraviti 1x PBS pufer, smo odvzeli 10 mL 10x založne raztopine in ji dodali 90 mL avtoklavirane (sterilne) dH<sub>2</sub>O. 1x PBS pufer smo hranili pri temperaturi 4 °C.

**3.1.14 Merilne aparature, laboratorijski pribor in oprema**

Merilne aparature, laboratorijski pribor in oprema, ki smo jih uporabljali pri laboratorijskem delu, so predstavljeni v preglednici 23 in 24.

**Preglednica 23: Laboratorijski pribor, ki smo ga potrebovali pri eksperimentalnem delu.**

Table 23: Laboratory service used in the experimental work.

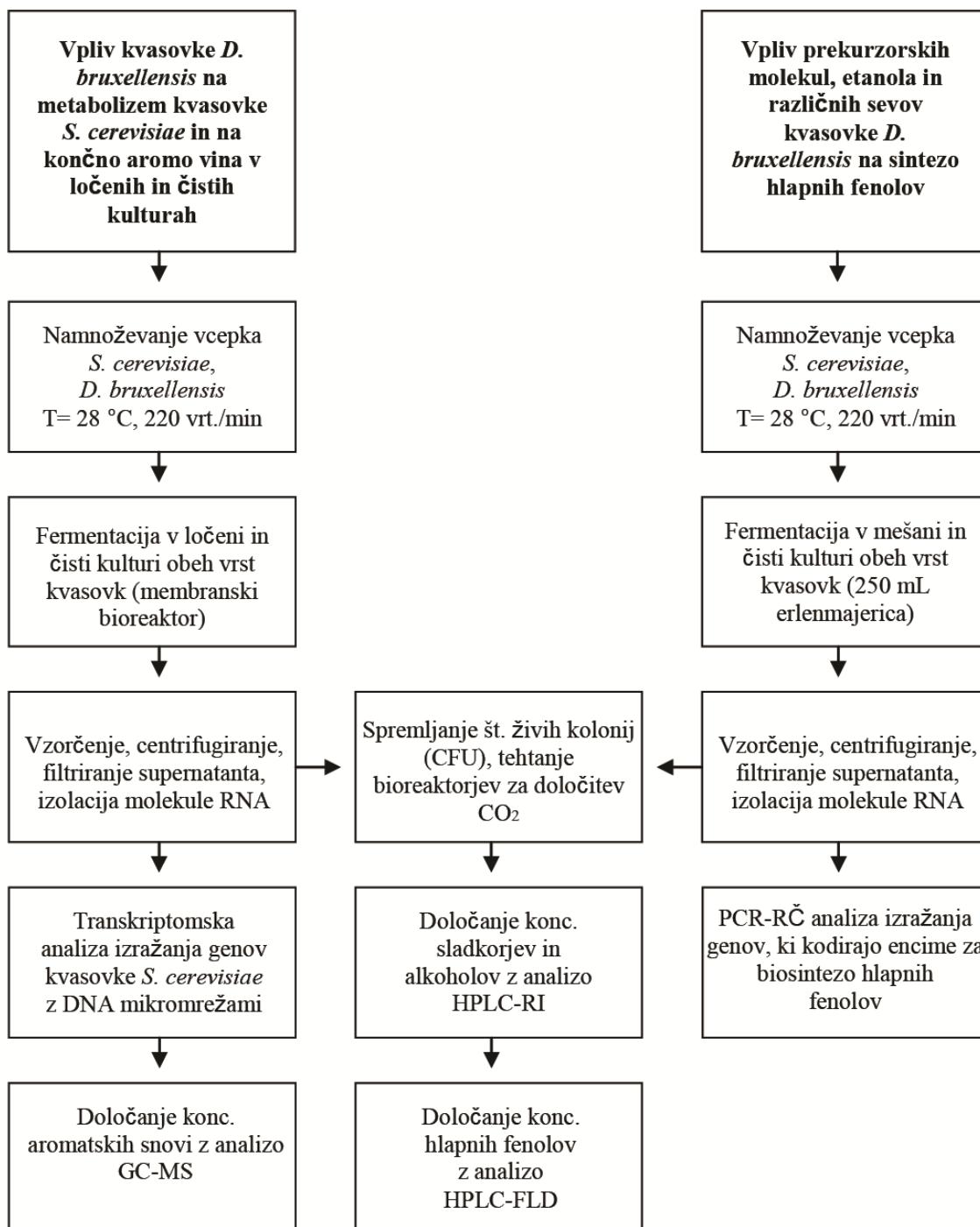
<b>Naziv</b>	<b>Proizvajalec</b>
Mikrocentrifugirke; 1,5 mL; 2 mL; 0,2 mL	Eppendorf, Nemčija
Erlenmajerice 200 mL	Schott Duran, Nemčija
Plastične centrifugirke (falkonke); 50 mL	TPP, Sigma
Števec kolonij	Bio Kobe, Japan
Magneti	Brand GMBH, Nemčija
Nastavki za pipete	Gilson, Francija
Mikrotiterske ploščice formata 96	Nunc
Optične adhezivne folije MicroAmp® za tesnenje	Abi Prism™, Applied Biosystems
Filtri Phenex; velikost por 0,2 µm	Phenomenex, Italija
20 mL steklene viale Varian	Sigma
Injekcijske brizgalke	BD, ZDA
Viale s pokrovčki	Supelco, Sigma, Nemčija
Mikrotiterske plošče formata 96 z optičnim dnom	MicroAmp®, Applied Biosystems
PCR stripi	Eppendorf, Nemčija
Magneti	Brand GMBH, Nemčija
Steklene kroglice za razmaz kolonij	/
Steklene kroglice za razbijanje celic (400 µm pore)	Sigma, Nemčija
Plastične centrifugirke (falkonke); 15 mL	TPP, Sigma
Sterilne plastične cepilne zanke	Labortechnika Golias, Slovenija
Števne komore Bücker-Türk	Brand, Nemčija

**Preglednica 24: Merilne aparature in oprema, ki smo jih potrebovali pri eksperimentalnem delu**  
Table 24: Laboratory equipment for experimental work accomplishment.

Naziv	Oznaka	Proizvajalec
Aparatura za PCR v realnem času	ABI PRISM™ 7500	Applied Biosystems, ZDA
Brezprašne komore	PIO LFVP 12	Iskra, Slovenija
Homogenizator	Bullet Blender Storm	Next Advance, Inc.
Aparatura za PCR	GeneAmp DNA thermal	Perkin Elmer, Albertwille
Centrifuge	3K305415C	Sigma, ZDAEppendorf, Nemčija
Avtoklav		Sutjeska, Jugoslavija
Inkubator grelno-hladilni	BTES_frigomat	Termo Iskra, Slovenija
Inkubator		Kambič
Digestorij		Iskra, Slovenija
Hladilniki		LTH, SlovenijaGorenje, Slovenija
Magnetno mešalo	RCT basic	IKA, Nemčija
Programska oprema za HPLC	Eurochrom 2000	Knauer, Nemčija
Filtracija podatkov iz DNA čipov	BRB-ArrayTools V4.2	(Simon in sod., 2007)
Mikroskop	DM4000 B	Leica, Nemčija
Ledomat		
Programska oprema za konstruiranje oligonukleotidnih začetnikov	Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research, ZDA
Sistem za tekočinsko kromatografijo		Knauer, Nemčija
Mikrovalovna pečica	Sanyo	Sanyo, ZDA
Omara za sušenje steklovine	SO-250	Elektromedicina, Slovenija
pH meter	Seven Multi	Mettler Toledo, ZDA
Sepktrofotometer	Lambda Bio Plus	Perkin-Elmer, ZDA
Ultrazvočna kopel	Sonis Pio	
Sistem za analizo kvalitete RNA	Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, ZDA
Grupiranje in funkcionalna anotacija	EXPANDER package 4.1	(Shamir in sod., 2005)
Robotski avtozorčevalci	Midas	Spark, Holland
Kapilarna kolona za HPLC	ZB-FFAP	Phenomenex Inc.
Spektrofluorometrični čitalec mikrotiterskih ploščic	Safine 2	Tecan, Švica
Fluorescenčni detektor za HPLC	Shimadzu RF-551	Kyoto, Japan
Plinski kromatografski sistem	Thermo-Finnigan Trace-GC	Thermo Finnigan Italija
Programska oprema za izračun relative expresije genov z PCR RČ	Relative expression software tool (REST)	(Pfaffl in sod., 2002)
Sistem za kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)	Elite LaChrome	Hitachi High Technologies, ZDA
Vlakna za mikroekstrakcijo na trdni podlagi (GC-MS)	DVB/CAR/PDMS vlakna, Stable Flex	Supelco
Zamrzovalnik (-20 °C)	Economic	Gorenje, Slovenija
Masno selektivni detektor	Quadrupole Trace-DSQ	Thermo Electron Corp., ZDA
Robotski avtozorčnik	COMBI-PAL	CTC analytics, Switzerland
Vakuumska črpalka	Air KKDet	Cole-Parmer, ZDA
HPLC kolona za separacijo sladkorjev in alkoholov	Aminex HPX-87H ionsko izmenjevalna kolona	Biorad, ZDA

### 3.2 METODE

V tem poglavju so opisane vse metode, s katerimi smo izvedli vse eksperimentalne naloge. Metode so razdeljene na dva dela, in sicer na postopke, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju vpliva kvasovke *D. bruxellensis* na metabolizem aromatskih snovi kvasovke *S. cerevisiae* in na postopke, ki smo jih uporabili pri ugotavljanju vpliva prekurzorskih molekul, etanola in različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* na sintezo hlapnih fenolov v mešanih fermentacijah (slika 2).



**Slika 2: Shema laboratorijskih metod za ugotavljanje vpliva kvasovke *D. bruxellensis* na metabolizem aromatskih snovi kvasovke *S. cerevisiae* in ugotavljanje vpliva prekurzorskih molekul, etanola in različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* na sintezo hlapnih fenolov v mešanih fermentacijah.**

Figure 2: Flow chart of the experiments for the determination of the impact of yeast *D. bruxellensis* on the metabolism of aromatic compounds of yeast *S. cerevisiae* and studying the impact of precursor molecules, ethanol and different strains of yeast *D. bruxellensis* on the synthesis of volatile phenols in mixed culture fermentations.

### **3.2.1 Vpliv kvasovke *D. bruxellensis* na metabolizem kvasovke *S. cerevisiae* in na končno aroma vina v membransko ločenih kulturah**

V tem tematskem sklopu smo želeli raziskati, ali ima kvasovka *D. bruxellensis* vpliv na rast in na metabolizem aromatskih snovi kvasovke *S. cerevisiae*. Obe kvasovki smo inokulirali v obliki ločenih kultur v membranskem bioreaktorju. Zanimal nas je tudi vpliv membransko ločenih kultur obeh kvasovk na proizvodnjo hlapnih fenolov, aromatskih estrov, višjih alkoholov in maščobnih kislin. Metabolizem kvasovke *S. cerevisiae* smo spremljali z merjenjem izražanja celotnega genoma z DNA mikromrežami.

#### **3.2.1.1 Fermentacije v membranskem bioreaktorju**

Vse fermentacije, ki so bile namenjene za transkriptomsko analizo z DNA mikromrežami, smo izvedli v membranskih bioreaktorjih, v katerih sta bili kulturi kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* med seboj ločeni z membrano (slika 3). Fermentacije smo izvedli v treh ločenih paralelkah. Obe strani membrane v bioreaktorju smo napolnili z 200 mL umetnega mošta MS300 in ju inokulirali s kvasovkama *D. bruxellensis* ali *S. cerevisiae* v končni koncentraciji  $1 \times 10^6$  celic/mL. V vsak predel bioreaktorja smo s sterilno pinceto vnesli po eno sterilno magnetno mešalo. V primeru mešanih fermentacij smo kvasovko *S. cerevisiae* inokulirali na eno stran membrane, kvasovko *D. bruxellensis* pa na drugo stran. V primeru čistih fermentacij smo bodisi kvasovko *S. cerevisiae* ali *D. bruxellensis* nacepili le na eno stran bioreaktorja, druge strani pa nismo inokulirali. Fermentacije so potekale pri temperaturi 22 °C in pod konstantnim mešanjem na magnetni plošči pri 90 vrt. V prilogi G so predstavljene fotografije fermentacij v membranskih bioreaktorjih.

Vzorčenje fermentacij smo izvedli po 22 h, 92 h, 144 h in 187 h inkubacije. 10 mL vzorčne suspenzije kvasovk smo centrifugirali pri 4000x g za 5 min. Supernatant smo previdno odpipetirali v novo 15 mL falkonko, celični pelet pa smo nemudoma zamrznili v tekočem dušiku in ga shranili pri temperaturi -80 °C. Za transkriptomske analize smo celične pelete vzorčili le iz tiste strani membranskega bioreaktroja, ki smo jo inokulirali s kvasovko *S. cerevisiae*. Z namenom določitve sproščanja CO<sub>2</sub> (ozioroma določitve absolutne spremembe v gostoti mošta; glej podpoglavlje 3.2.1.6) in rasti kvasovk smo vse bioreaktorje dnevno tehtali in šteli kolonije na trdnem gojišču YPD, in sicer z metodo zaporednega redčenja po protokolu opisanem pod točko 3.2.1.5.

Uporabnost in primernosti membranskih bioreaktorjev za zagotavljanje podobnih pogojev fermentacije, kot so običajno doseženi v bioreaktorjih sestavljenih iz le enega predela, smo testirali tako, da smo biosintezo hlapnih fenolov, sladkorjev in alkoholov v membranskih bioreaktorjih primerjali z njihovo biosintezo v 250 mL erlenmajericah. Erlenmajerice smo pri tem napolnili 200 mL umetnega mošta MS300. V primeru mešanih fermentacij smo *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* skupaj inokulirali v isto erlenmajerico, ki smo jo napolnili z umetnim moštom MS300, pri čemer je bila za obe kvasovki končna koncentracija biomase  $1 \times 10^6$  celic/mL. Tako membranske bioreaktorje kot erlenmajerice smo takoj po inokulaciji zatesnili z gumijastimi zamaški, te pa smo prebodli z dvema sterilnima iglama za izhajanje CO<sub>2</sub>. V vsako 250 mL erlenmajerico smo vnesli po eno sterilno magnetno

mešalo. Fermentacije v membranskih bioreaktorjih in erlenmajericah so potekale pri temperaturi 22 °C in pod konstantnim mešanjem na magnetni plošči pri 90 vrt.

### 3.2.1.2 Namnoževanje biomase za pripravo inokuluma

Za pripravo inokuluma smo eno kolonijo kvasovke *D. bruxellensis* ali *S. cerevisiae* prenesli iz trdnega gojišča YPD v 100 mL tekočega gojišča YPD. Inkubacija inokuluma je potekala na stresalniku, in sicer 27 ur za *S. cerevisiae* in 50 ur za *D. bruxellensis* pri temperaturi 28 °C in 220 vrt/min. Pred postopkom inokulacije smo suspenzijo kvasovk za 5 min centrifugirali pri 1500x g in jo resuspendirali v 10 mL sintetičnega mošta MS300. Pod mikroskopom smo s pomočjo števne komore Bürker-Türk prešteli celice kvasovk, in sicer po protokolu, ki je opisan v poglavju 3.2.1.4. Po določitvi koncentracije celic v 1 mL gojišča, smo inokulirali sintetični moš MS300 do končne koncentracije  $1 \times 10^6$  celic/mL.

### 3.2.1.3 Fermentacije v erlenmajericah

Vse fermentacije so bile izvedene v mikroaerobnih pogojih v 250 mL erlenmajericah napolnjenih z 200 mL sintetičnega mošta MS300. Erlenmajerice smo zatesnili z gumijastimi zamaški, te pa smo prebodli z dvema sterilnima iglama za izhajanje CO<sub>2</sub>. Vse fermentacije v erlenmajericah so trajale okoli 220 ur (8,8 dni) pri temperaturi 22 °C in pod konstantnim mešanjem na magnetni plošči pri 90 vrt. V primeru čistih fermentacij smo v gojišče inokulirali kvasovko *D. bruxellensis* ali *S. cerevisiae*, in sicer do končne koncentracije  $1 \times 10^6$  celic/mL. V primeru mešanih fermentacij pa smo po en sev *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae* nacepili skupaj v isto erlenmajerico, in sicer vsakega v končni koncentraciji  $1 \times 10^6$  celic/mL.

Koncentracije inokuluma smo določili s štetjem celic pod svetlobnim mikroskopom z uporabo števne komore Bürker-Türk, in sicer po opisu v poglavju 3.2.1.4. Mešane in čiste fermentacije smo izvajali v treh samostojnih paralelkah. Z namenom določitve sproščanja CO<sub>2</sub> (oziroma določitve absolutne spremembe v gostoti mošta; glej podpoglavlje 3.2.1.6) in rasti kvasovk smo vse bioreaktorje dnevno tehtali in šteli kolonije na trdnem gojišču YPD, in sicer z metodo zaporednega redčenja po protokolu opisanem pod točko 3.2.1.5.

### 3.2.1.4 Določanje koncentracije celic pod mikroskopom

V primeru priprave inokuluma smo določili koncentracijo kvasovk v inokulumu. Erlenmajerico smo najprej močno premešali, tako da je suspenzija kvasovk postala popolnoma uniformna. Iz inokuluma namnoženih kvasovk smo nato v laminariju s pipeto odvzeli 20 µL suspenzije kvasovk in jo nanesli na 100 µL globoko Bürker-Türkovo števno ploščico (BT, Brand, Wertheim, Germany). Števno ploščico smo vstavili v mikroskop pod 100-kratno povečavo in prešteli celice znotraj štirih velikih kvadratov, ki sestavljajo števno mrežo znotraj Bürker-Türkove komore. Nato smo izračunali povprečno število celic v enem kvadratku in z enačbo izračunali koncentracijo kvasovk na mililiter.

$$\text{Št.celic/mL} = \frac{\text{Povp.št.celic}}{V} \times 1000 \quad (1)$$

Višina<sub>komore</sub> = 0,1 mm

Površina<sub>kvadrata</sub> = 0,04 mm<sup>2</sup>

V = Površina<sub>kvadrata</sub> x Višina<sub>komore</sub> = 0,004 mm<sup>3</sup>

### 3.2.1.5 Štetje kolonij na ploščah

V fermentacijski suspenziji je število celic kvasovk tako veliko, da je potrebno suspenzijo pred nacepitvijo in razmazom na YPD agar plošče serijsko redčiti. Da bi dobili števne plošče z 10 do 300 kolonijami, smo vzorčno suspenzijo serijsko redčili po Kochu, in sicer v sterilnem pufru PBS (Koch, 1994). Redčitve so bile 10-kratne, pri čemer smo po 100 µL suspenzije serijsko redčili v 900 µL fiziološkega pufra PBS. Iz tako pripravljene redčitve 10<sup>-2</sup> smo nato zopet prenesli 100 µL v novo mikrocentrifugirko, ki je vsebovala 900 µL sterilnega pufra PBS. Tako smo pripravili redčitev 10<sup>-3</sup>. Na koncu smo 100 µL primerne redčitve (odvisno od rastne krivulje kvasovk) odpipetirali na sterilno YPD agar ploščo. Nacepek smo razmazali s sterilno hokejko in petrijevo ploščo zaprli in jo prenesli v inkubator za 40 (v primeru kvasovke *S. cerevisiae*) ali 70 (v primeru počasi rastoče kvasovke *D. bruxellensis*) urno inkubacijo pri temperaturi 28 °C. Za dve posamezni redčitvi istega vzorca smo nacepili po tri ločene petrijeve plošče. Celotno delo je potekalo pod sterilnimi pogoji v laminariju.

Po inkubaciji smo iz izbrane redčitve (redčitev, ki vsebuje 10 do 300 kolonij) prešteli kolonije na ploščah in izračunali povprečje iz treh petrijevih plošč za vsak vzorec posebej. Nato smo po naslednji enačbi izračunali število kolonij v enem mililitru.

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{Povp.št. kolonij}}{V_{\text{nacep.}} \times R} \quad (2)$$

R...primerna redčitev, ki smo jo uporabili za nacepitev na ploščo (na primer 10<sup>-3</sup>)

V<sub>nacep.</sub> = 0,1 mL (nacepka na petrijevo ploščo)

Povp.št. kolonij...povprečno število preštetih kolonij

CFU/mL...število kolonijskih enot na mL ("Colony-Forming Units")

Število kolonij na mililiter uporabljam za ocenitev števila živih celic v vzorcu. Ocena nikakor ni točna, ker se lahko nastale kolonije kvasovk prekrivajo in ker lahko ena kolonija nastane iz več kot ene celice kvasovk.

Za določitev števila kolonij kvasovke *D. bruxellensis* v mešanih kulturah s kvasovko *S. cerevisiae* smo uporabili YPDagar plošče z dodanim 0,01 % cikloheksamidom (Sigma-Aldrich). V prisotnosti cikloheksamida, je rast kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* onemogočena, na rast *D. bruxellensis* pa antibiotik nima vpliva. Kolonije kvasovke *S. cerevisiae* smo v mešanih kulturah določili na navadnih YPDagar ploščah, na katerih so kolonije kvasovke *S. cerevisiae* hitro prerasle majhne kolonije počasi rastoče kvasovke *D. bruxellensis*.

### 3.2.1.6 Merjenje gostote umetnega mošta

Med fermentacijo se sladkorji pretvarjajo do etanola in plina CO<sub>2</sub>, pri čemer se specifična masa umetnega mošta zmanjša predvsem zaradi izhajanja plina CO<sub>2</sub> iz sistema. V pivovarstvu kinetiko pretvorbe sladkorjev določujejo z merjenjem upada v specifični masi pivine. Tako imenovana atenuacija je definirana kot odstotek upada specifične mase pivine.

$$\text{Atenuacija} = \frac{100\% \times (\text{specif. masa}_{\text{čas1}} - \text{specif. masa}_{\text{čas2}})}{(\text{specif. masa}_{\text{čas1}} - 1)} \quad (3)$$

Ko med fermentacijo pivina (ozioroma mošt v primeru vinarstva) doseže najnižjo specifično maso, govorimo o doseženi atenuacijski limiti (Andrews in Gilliland, 1952). Atenuacijska limita nam pove, kdaj je prišlo do popolne zaustavitve v pretvorbi sladkorjev do etanola in CO<sub>2</sub>.

Specifična masa umetnega mošta MS300 je definirana kot količnik gostote umetnega mošta MS300 in gostote vode.

$$\text{SM}_{\text{MS300}} = \frac{\rho_{\text{MS300}}}{\rho_{H_2O}} \quad (4)$$

$$\rho_{\text{MS300}} = \text{SM}_{\text{MS300}} \times \rho_{H_2O} \quad (5)$$

Pri 22 °C je gostota vode približno 1 kg/L.

$$\rho_{H_2O}(22\text{ }^{\circ}\text{C}) = 0,9977 \text{ kg/L} \approx 1 \text{ kg/L}$$

$$\rho_{\text{MS300}}(22\text{ }^{\circ}\text{C}) = \text{SM}_{\text{MS300}} \times \rho_{H_2O} \approx \text{SM}_{\text{MS300}} \times 1 \text{ kg/L} = \text{SM}_{\text{MS300}} [\text{kg/L}] \quad (6)$$

Potemtakem je pri 22 °C sprememba v specifični masi umetnega mošta MS300 približno enaka spremembi v gostoti umetnega mošta MS300.

$$\Delta\rho_{\text{MS300}}(22\text{ }^{\circ}\text{C}) \approx \Delta\text{SM}_{\text{MS300}} [\text{kg/L}] \quad (7)$$

Stopnjo in kinetiko fermentacij smo v vseh fermentacijah spremljali z merjenjem upada gostote umetnega mošta MS300. Za tovrstno spremjanje je bilo najprej potrebno izmeriti maso praznih bioreaktorjev (membranskih bioreaktorjev ali 250 mL erlenmajeric) opremljenih z vsemi komponentami, kot so zamaški z iglami in magnetna mešala. Masa praznih bioreaktorjev je bila torej ekvivalentna masi popolnoma sestavljenih bioreaktorjev, ki pa niso vsebovali umetnega mošta in celic kvasovk. Tehtanje je potekalo na tehnicni Sartorius-excellence (Nemčija) z natančnostjo tehtnice ± 0,05 g. Ko smo začeli s poskusi fermentacij, smo pred vsakim vzorčenjem v laminariju vse bioreaktorje stehtali. Po vzorčenju smo bioreaktorje zopet stehtali in jih vstavili nazaj v inkubator, v katerem je nadalje potekala fermentacija.

Legenda:

- $m_p$ ... masa praznih bioreaktorjev  
 $m_{pred(1)}$ ... masa pred prvim vzorčenjem  
 $m_{po(1)}$ ... masa po prvem vzorčenju  
 $m_{pred(2)}$ ... masa pred drugim vzorčenjem  
 $m_{po(2)}$ ... masa po drugem vzorčenju

Maso fermentacijskega mošta MS300 po prvem vzorčenju izračunamo po naslednji enačbi

$$m_{MS300(1)} = m_{po(1)} - m_p \quad (8)$$

Maso fermentacijskega mošta MS300 po (n)-tem vzorčenju izračunamo po naslednji enačbi

$$m_{MS300(n)} = m_{po(n)} - m_p \quad (9)$$

Masa fermentacijskega mošta MS300 je večinoma sestavljena iz vode, zato smo privzeli, da pri 22 °C en gram umetnega mošta MS300 zavzame približno en mililiter volumna. Velja namreč, da pri 22 °C en gram vode zavzame približno en mililiter volumna. Potemtakem X gramov umetnega mošta MS300 zavzame približno X mililitrov volumna.

Torej lahko zapišemo, da je X gramov umetnega mošta MS300 po (n)-tem vzorčenju zavzelo približno X mililitrov volumna.

$$m_{MS300(n)} = X [g] \quad (10)$$

$$V_{MS300(n)} = X [mL] \quad (11)$$

Tako smo iz mase fermentacijskega gojišča MS300 po (n)-tem vzorčenju pridobili volumen, ki ga je zavzemalo fermentacijsko gojišče MS300 po (n)-tem vzorčenju.

Upad v gostoti umetnega mošta MS300 (v g/mL) med prvim in drugim vzorčenjem lahko izračunamo po naslednji enačbi.

$$\Delta\rho_{MS300(1)} = \frac{(m_{po(1)} - m_{pred(2)})}{V_{MS300(1)}} \quad (12)$$

Upad v gostoti umetnega mošta MS300 (v g/L) med (n)-tim in (n+1)-tim vzorčenjem lahko izračunamo po naslednji enačbi.

$$\Delta\rho_{MS300(n)} = \frac{(m_{po(n)} - m_{pred(n+1)}) \times 1000}{V_{MS300(n)}} \quad (13)$$

Absolutno spremembo v gostoti umetnega mošta MS300 (v g/L), ki je nastala od začetka fermentacije pa do (n)-tega vzorčenja izračunamo po naslednji enačbi.

$$|\Delta\rho_{MS300}| = \Delta\rho_{MS300(1)} + \Delta\rho_{MS300(2)} + \Delta\rho_{MS300(3)} + \dots + \Delta\rho_{MS300(n)} \quad (14)$$

V našem delu smo rezultate predstavili v obliki absolutne spremembe v gostoti mošta (v g/L), saj to vrednost raziskovalci iz področja vinarstva najpogosteje enačijo s koncentracijo CO<sub>2</sub>, ki se je sprostila iz sistema (v g/L) (Nardi in sod., 2010; Rossouw in sod., 2011; Sáez in sod., 2010). Potemtakem smo za lažjo primerljivost naših rezultatov z rezultati iz drugih raziskav, vse vrednosti podali v absolutni spremembi gostote mošta.

### 3.2.1.7 Ekstrakcija estrov, hlapnih kislin in višjih alkoholov in določanje njihove koncentracije

Pri vzorčenju fermentacije smo sterilno odpipetirali 5 mL celične suspenzije in jo centrifugirali pri 4000x g za 5 minut. Iz pripravljenih supernatantov smo ekstrahirali aromatske snovi z uporabo mikroekstrakcije na trdni podlagi (SPME). Pri tem smo v vzorce najprej odpipetirali interni standard 4-metil-2-pentanol, in sicer do končne koncentracije 0,1 g/L.

Založna raztopina internega standarda je bila pripravljena v raztopini natrijevega klorida (1,75 g/L). Vse vzorce s standardi smo pripravili v 20 mL vialah. Za samo ekstrakcijo smo v zgornji del viale, ki ga raven tekočine ni dosegel, vnesli posebno divinil/benzen-/karboksen/polidimetilsilosansko vlakno (Stable Flex DVB/CAR/PDMS, 50/30 µm 50/30 µm; Supelco). Viale smo nato inkubirali 40 minut pri 40 °C, pri konstantnem mešanju na magnetni plošči (1100 vrt). Po ekstrakciji smo vlakno vstavili v injektorski priključek za plinsko kromatografijo (GC).

Analiza estrov, hlapnih kislin in višjih alkoholov je bila izvedena na plinskem kromatografskem sistemu Thermo Finnigan Trace-GC. Sistem je bil sestavljen iz masno selektivnega detektorja Quadrupole Trace-DSQ (Thermo Electron Corporation, Austin, Texas - USA) in robotskega avtozorčnika COMBI-PAL (CTC analitike, Zwingen-Švica). Ločevanje estrov, hlapnih kislin in višjih alkoholov je potekalo znotraj kapilarne kolone Zebron ZB-FFAP (dolžina 30 m, 0,25 mm I.D., debelina filma 0,25 µm). Hitrost pretoka je bila nastavljena na 0,8 mL/min, temperatura injektorja je bila 260 °C, helij pa smo uporabili za nosilni plin (mobilna faza). Temperaturni program pečice je bil nastavljen na 35 °C za 15 min, nato pa je temperatura naraščala po 3 °C/min, dokler ni dosegla končnih 200 °C. Za kalibracijo smo uporabili notranje standarde (Sigma), ki so bili ekvivalentni vsaki posamezni analizirani aromatski komponenti. Kvantifikacijo kromatografskih spektrov smo izvedli s programsko opremo Xcalibur 2.0.7. Končne koncentracije aromatskih snovi smo določili s primerjavo naših meritev z bazo podatkov, ki je vsebovala informacije o retenzijskih časih posameznih aromatskih snovi in o njihovi specifični atomski masi.

### 3.2.1.8 Merjenje koncentracije etanola, glicerola, glukoze in fruktoze

Pri vzorčenju fermentacije smo sterilno odpipetirali 1mL celične suspenzije in jo centrifugirali pri 4000x g za 5 minut. Supernatante smo nato filtrirali skozi 0,2 µm filter (Phenomenex, Italy). Glukozo, fruktozo, etanol in glicerol smo določili z uporabo sistema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) Hitachi Elite LaChrome (ZDA), ki je bil povezan z ionsko izmenjalno kolono Aminex HPX-87H.

Temperatura v koloni Aminex je bila naravnana na 60 °C, v refraktometričnem detektorju (Knauer, Nemčija) pa je bila umerjena na 40 °C. Pretok 2,5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> skozi kolono je bil za prvih 9 min nastavljen na 0,5 mL/min, za naslednje 4 minute na 0,25 mL/min in za končnih 20 min na 0,50 mL/min. Retenzijski čas glukoze je bil 8,5 minut, fruktoze 9,5 minut, glicerola 12,5 minut in etanola 19,5 minut. Koncentracije sladkorjev in alkoholov smo določili s pomočjo uporabe umeritvenih krivulj, ki smo jih izračunali iz redčitvenih vrst standardov. Umeritvene krivulje smo pripravili po postopkih predstavljenih v podpoglavljih 3.1.11.3.1 - 3.1.11.3.3.

### 3.2.1.9 Merjenje koncentracije hlapnih fenolov

Po vzorčenju smo pripravili supernatante na enak način kot pri merjenju koncentracij etanola, glicerola, glukoze in fruktoze. Koncentracije hlapnih fenolov smo določili z uporabo sistema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) Knauer (Berlin, Nemčija). Naprava je bila sestavljena iz avtovzorčnika Midas (Spark, Emmen, Nizozemska) iz dveh črpalk Knauer K1001 WellChrom opremljenimi z 10 mL črpalnimi glavami (Berlin, Nemčija), iz dinamične mešalne komore Knauer (Berlin, Nemčija) in iz fluorescentnega detektorja Shimadzu RF-551 (Shimadzu, Kyoto, Japonska). Detektor je bil nastavljen na visoko občutljivost, pri čemer smo ekscitacijsko valovno dolžino naravnali na 280 nm in emisijsko valovno dolžino na 333 nm. Ločevanje hlapnih fenolov je potekalo v fenilni koloni XBridge (130 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm, 1/pkg; Waters, Milford, MA, USA) pri čemer smo za mobilno fazo uporabili 27 % acetonitril. Hitrost pretoka je bila 1 mL/min. Retenzijski čas 4-vinilfenola je bil 12 minut, 4-vinilgvajakola 13 minut, 4-etylfenola 14 minut in 4-etylgvajakola 15 minut. Za kvantifikacijo hlapnih fenolov smo uporabili umeritvene krivulje s standardnimi raztopinami 4-vinilgvajakola (Sigma), 4-vinilfenola (Sigma), 4-etylgvajakola (Sigma) in 4-etylfenola (Sigma). Te smo pripravili po navodilih v podpoglavljih 3.1.11.3.4 - 3.1.11.3.7.

### 3.2.1.10 Izolacija celokupne RNA

Celokupno RNA smo izolirali iz 10 mL suspenzije, ki je vsebovala vsaj 10<sup>7</sup> kvasovk/mL. Suspenzijo smo centrifugirali pri 4000x g, supernatant smo odstranili in peletu dodali 500 µL Trizol reagenta in 300 µL ledeno hladnih steklenih kroglic s premerom 400 µm. V primeru vzorcev iz fermentacij smo 10 mL suspenzije celic po vzorčenju centrifugirali, odstranili supernatant in pelet zamrznili v tekočem dušiku. Zamrznjene pelete smo hranili pri temperaturi -80 °C.

Zaradi nevarnih fenolnih hlapov je delo s Trizol reagentom striktno potekalo v digestoriju. Celično steno kvasovk smo razbili na mehanski način z 40 min vorteksiranjem mešanice steklenih kroglic in celične suspenzije. Tekom vorteksiranja smo pokrovčke mikrocentrifugirk zaščitili s parafilmom. Po vorteksiranju smo vsebino mikrocentrifugirk prenesli v 15 mL falkonke in jim dodali 4 mL Trizol reagenta. Te smo nato inkubirali 5 min na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vsebino centrifugirali pri 12,000 xg za 10 min (4 °C), supernatant pa smo prenesli v nove falkonke. Proces centrifugiranja in prenosa supernatanta smo ponovili še enkrat. Superantantu smo nato dodali 800 µL kloroform, falkonke smo tesno zaprli z zamaškom in jih z roko močno stresali 15 sekund. Po 15 sekundah smo falkonke inkubirali na sobni temperaturi za 15 min in jih centrifugirali na 12,000 x g za 10–15 min pri temperaturi 4 °C. Po centrifugiranju smo zgornjo vodno fazo prenesli v sveže falkonke in ji dodali 3 mL izopropanola. Falkonke smo nato vorteksirali za 10 sekund, jih inkubirali na sobni temperaturi za 10 min in centrifugirali pri 12,000x g za 8 min pri 4 °C. Supernatant smo previdno odpipetirali in pelet raztopili v 8 mL 75 % etanola. Vsebino smo zopet centrifugirali pri 7,500x g za 5 min pri 4 °C. Po centrifugiranju smo etanol previdno odpipetirali in preostali pelet 5 min sušili v digestoriju. Na koncu smo pelet raztopili v 50 µL DEPC ddH<sub>2</sub>O in ga shranili na temperaturo -80 °C. Celokupno RNA smo izolirali pod strogimi pogoji dela z RNA, kar je vključevalo delo v digestoriju, ki smo ga predhodno očistili z 0,5 % SDS. Pipete in vso potrebno laboratorijsko opremo smo dodatno očistili z 0,5 % SDS.

### 3.2.1.11 Transkriptomska analiza izražanja genoma kvasovke *S. cerevisiae*

Analizo izražanja genoma kvasovke *S. cerevisiae* smo tehnično naredili tako, da smo iz celic kvasovk *S. cerevisiae* izolirali RNA in jo prepisali v označeno Cy3-cRNA, to pa smo hibridizirali na komercialne DNA mikromreže Agilent Yeast (V2) (p/n G4813A- 016322). Podrobnejši opis postopkov je predstavljen spodaj.

Na začetku smo kakovost celokupne RNA preverili z mikrofluidno aparaturom Agilent Bioanalyzer 2100. Rezultati analize kakovosti celokupne RNA v vzorcih so predstavljeni v prilogi E.

Sledila je priprava sond in hibridizacija sond na DNA mikromreže Agilent Yeast (V2) (p/n G4813A- 016322). Hibridizacijo smo izvedli v skladu z navodili v kompletu Agilent Quick Amp (p/n 5190-0442) (Agilent..., 2008).

### Pogoji za delo s celokupno RNA

Pripravo cRNA sond, označevanje sond s fluorescenčnim barvilkom Cy-3, hibridizacijo in lasarsko odčitanje fluorescenčnih signalov iz DNA mikromrež smo izvajali v pogojih dela z RNA.

Ti vključujejo:

- preverjanje integritete celokupne RNA v vzorcih, pred postopki označevanja in hibridizacije

- Da bi preprečili kontaminacijo reagentov z RNazami moramo vedno nositi laboratorijske rokavice ter delo opravljati v brezprašnih pogojih. Uporabljati moramo sveže raztopine in DEPC ddH<sub>2</sub>O, ki ne vsebuje RNaz. Nastavki za pipete morajo vsebovati filtrsko pregrado za aerosol.
- Vzdrževati moramo čisto delovno površino
- Pri uporabi zamrznjenih reagentov pazimo, da reagente alikvitiramo s pipeto, jih hitro centrifugiramo in do uporabe odložimo na 0 °C. Po uporabi jih hitro shranimo na -80 °C ali -20 °C (odvisno od reagenta).
- Na splošno sledimo varnostnim predpisom, ki veljajo za biološki varnostni razred številka 1.

### Prvi korak: Priprava kontrol za standardizirano hibridizacijo na DNA mikromreže

Najprej smo pripravili mešanico Spike-In, ki je vsebovala deset pozitivnih kontrolnih transkriptov označenih s fluorescenčnim barvilkom Cy-3. Priprava je potekala po naslednjem postopku:

- Naravnaj vodne kopeli na 37 °C, 65 °C, 80 °C, 40 °C in 70 °C.
- Na vrtinčniku močno premešaj mešanico Spike-In.
- Mešanico za 5 minut segrej na temperaturo 37 °C in še enkrat močno premešaj na vrtinčniku.
- Mešanico na hitro centrifugiraj.
- Glede na to da želimo hibridizirati 200 ng celokupne RNA, smo mešanico Spike-In trikrat serijsko redčili in 2 µL končne redčitvene mešanice vnesli v 200 ng celokupne RNA. Serijske redčitve so predstavljene v preglednici 25.

#### Preglednica 25: Serijske redčitve mešanice Spike-In in vnos mešanice v 200 ng vzorčne RNA.

Table 25: Serial dilutions of a mixture of Spike-In controls and the insertion of this mixture into 200 ng of sample RNA.

Začetna količina RNA	Serijske redčitve			Volumen mešanice Spike-In (µL) na eno reakcijo
Celokupna RNA (ng)	Prva	Druga	Tretja	
200	1:20	1:25	1:10	2 (redčitve 1:5000)

### Drugi korak: Priprava reakcije za označevanje RNA vzorcev

Reakcijsko mešanico za označevanje RNA vzorcev smo pripravili po naslednjem postopku:

- Odpipetiraj 3,5 µL celokupne RNK (z dodano mešanico Spike-In) v koncentraciji 133,3 mg/L (vsebuje 200 ng vzorčne RNA), in sicer v 1,5 mL mikrocentrifugirko.
- Priprava mešanice za T7 Promotor Primer: Za eno reakcijo zmešaj 0,8 µL raztopine T7 Promotor Primer v 1 µL ddH<sub>2</sub>O.

- 1,8 µL mešanice za T7 Promotor Primer prenesi v 3,5 µL celokupne RNK
- Nastalo mešanico denaturiraj z 10 minutnim inkubiranjem pri temperaturi 65 °C v rotirajoči vodni kopeli
- Nato reakcijo inkubiraj za 5 minut na ledu
- Segrej pufer »5X first strand« na temperaturo 80 °C za 3 do 4 minute. S segrevanjem zagotovimo, zadostno resuspenzijo komponent v pufru.
- Pripravi mešanico cDNA po navodilih v preglednici 26.

**Preglednica 26: Priprava mešanice cDNA.**

Table 26: Preparation of cDNA mixture.

Komponenta	Volumen na reakcijo (µL)
Pufer 5X First Strand	2
0,1 M DTT	1
Mešanica 10 mM dNTP	0,5
Mešanica AffinityScript RNase Block	1,2
Končni volumen	4,7

- Na hitro centrifugiraj mešanico cDNA in prenesi 4,7 µL te mešanice v celokupno RNA (ki vsebuje T7 Promoter Primer). Vsebino inkubiraj v rotirajoči vodni kopeli za 2 uri pri temperaturi 40 °C. Vzorce nato inkubiraj v rotirajoči vodni kopeli za 15 minut pri temperaturi 70 °C. Inkubacija pri temperaturi 70 °C inhibira delovanje encima AffinityScript.
- Pripravi transkripcijsko mešanico po navodilih v preglednici 27.

**Preglednica 27: Priprava transkripcijske mešanice**

Table 27: Preparation of transcription mixture.

Komponenta	Volumen na reakcijo (µL)
ddH2O brez nukleaz in RNaz	0,75
Pufer 5X Transcription	3,2
0,1 M DTT	0,6
Mešanica NTP	1
Mešanica encima T7 RNA Polymeraze	0,21
Cyanine 3-CTP	0,24
Končni volumen	6

- V vsako vzorčno mešanico RNA dodaj 6 µL transkripcijske mešanice. Vsebino narahlo premešaj s pipeto in jo inkubiraj v rotirajoči vodni kopeli za 2 uri pri temperaturi 40 °C.

**Tretji korak: Čiščenje označene in pomnožene cRNA**

Čiščenje je potekalo po naslednjem protokolu:

- Dodaj 84 µL ddH2O (brez nukleaz) v vzorčne raztopine cRNA
- Dodaj 350 µL pufra RLT in dobro premešaj s pipetiranjem.

- Dodaj 250 µL absolutnega etanola in zopet dobro premešaj s pipetiranjem.
- Prenesi 700 µL vzorčne cRNA v mini kolono RNeasy, ki je vstavljena v 2 mL zbirno PVC tubo. Centrifugiraj vzorce pri temperaturi 4 °C za 30 sekund pri 13.000 obratih na minuto. Skupaj z zbirno tubo zavri vsebino, ki se je v njej nabrala.
- Prenesi mini kolono RNeasy v novo zbirno tubo in vanjo dodaj 500 µL pufra RPE (vsebuje etanol). Ponovno centrifugiraj vzorce pri 4 °C za 30 sekund pri 13.000 obratih na minuto. Tokrat zavri le vsebino v zbirni tubi in obdrži samo zbirno tubo.
- V kolono dodaj še 500 µL pufra RPE. Centrifugiraj vzorce pri 4 °C za 60 sekund pri 13.000 obratih na minuto. Skupaj z zbirno tubo zavri vsebino, ki se je v njej nabrala.
- Vsakršne ostanke pufra RPE se mora odstraniti, in sicer tako da se nemudoma prenese mini kolono RNeasy v novo 1,5 mL zbirno tubo in da se vsebino centrifugira pri 4 °C za 30 sekund pri 13.000 obratih na minuto. Takoj po centrifugiranju zamenjaj zbiralno tubo za novo.
- Izloči očiščeno cRNA iz mini kolone RNeasy, in sicer s prenosom mini kolone v novo 1,5 mL zbiralno tubo. Nato neposredno na membrano kolone dodaj 30 µL ddH<sub>2</sub>O (brez nukleaz). Počakaj 60 sekund, nato centrifugiraj pri 4 °C za 30 sekund pri 13.000 obratih na minuto. Po centrifugiranju lahko mini kolono zavriš.

### Četrti korak: Kvantifikacija molekul cRNA v vzorcih

Kvantifikacija je potekala po naslednjem protokolu:

- Zaženi programsko opremo NanoDrop, ki je vključena v spektrofotometer NanoDrop ND-1000 UV-VIS.
- Znotraj programa izberi možnost merjenja cRNA za mikromreže.
- Pred pričetkom merjenja moraš z ddH<sub>2</sub>O (brez nukleaz) očistiti površino za vnos vzorcev v spektrofotometer.
- Zato da smo lahko odšteli ozadje, smo najprej izmerili samo ddH<sub>2</sub>O (brez nukleaz), pri čemer smo na nastavek za vzorce nanesli le 2,0 µL ddH<sub>2</sub>O.
- Na očiščeni nastavek odpipetiraj 2,0 µL vzorca. Zopet očisti nastavek za vzorce in nanesi novi vzorec cRNA.
- Nato z naslednjo enačbo določi izkoristek vsake reakcije (Volumen uporabljen za izločitev cRNA iz mini kolone je znašal 30 µL):

$$\mu\text{g}_{\text{cRNA}} = \frac{\text{Konc.cRNA}}{1000} \times 30 \mu\text{L} \quad (15)$$

- Poleg izkoristka smo po naslednji enačbi izračunali tudi specifično aktivnost vsake reakcije:

$$\text{pmol}_{\text{Cy3}}/\mu\text{g}_{\text{cRNA}} = \frac{\text{Konc.Cy3}}{\text{Konc.cRNA}} \times 1000 \quad (16)$$

- Za hibridizacijo na stekelce, ki vsebuje 8 DNA mikromrež potrebujemo minimalno 0,825 µg cRNA z minimalno specifično aktivnostjo  $6 \text{ pmol}_{\text{Cy}3}/\mu\text{g}_{\text{cRNA}}$ .

### Peti korak: Hibridizacija

Najprej smo pripravili 10x raztopino Blocking reagenta:

- 10x raztopino Blocking reagenta smo redčili v 500 µL ddH<sub>2</sub>O (brez nukleaz)
- Raztopino smo narahlo premešali na vrtinčniku, jo segreli za 5 minut pri 37 °C in jo za 10 sekund centrifugirali.

Nato smo pripravili vzorce za hibridizacijo:

- Najprej smo naravnali vodno kopel na 60 °C.
- Nato smo za vsako stekelce, ki je vsebovalo po 8 DNA mikromrež, pripravili mešanico komponent in vzorčne cRNA po navodilih v preglednici 28. Mešanico smo pripravili v mikrocentrifugirki.

**Preglednica 28: Priprava mešanice za fragmentacijo vzorčne cRNA.**

Table 28: Preparing the mixture for the fragmentation of cRNA.

Komponenta	Volumen/stekelce z 8 DNA mikromrežami
cianin 3-označena in linearno pomnožena vzorčna cRNA	600 ng
10X Blocking reagent	5 µL
25X Fragmentacijski pufer	1 µL
ddH <sub>2</sub> O (brez nukleaz)	dopolni do 24 µL
Končni volumen	25 µL

- Pripravljeno mešanico smo narahlo premešali na vrtinčniku.
- Z namenom fragmentacije RNA smo mešanico inkubirali pri 60 °C, za natanko 30 minut.
- Po inkubaciji smo mešanico takoj prenesli na led za natanko eno minuto.
- Da bi ustavili proces fragmentacije, smo mešanici dodali 2x GEx hibridizacijski pufer HI-VRT, in sicer v razmerju 1:1 (glej preglednico 29).

**Preglednica 29: Priprava mešanice za hibridizacijo vzorčne cRNA na stekelce, ki je opremljeno z osmimi DNA mikromrežami**

Table 29: Preparation of a mixture for the hybridization of cRNA on slides that are equipped with eight DNA microarrays.

Komponente	Volumen za hibridizacijo s stekelcem, ki vsebuje 8 DNA mikromrež
Vzorčna cRNA iz fragmentacijske mešanice	25 µL
2x GEx hibridizacijski pufer HI-VRT	25 µL

- Pripravljeno hibridizacijsko mešanico smo premešali s previdnim pipetiranjem (pri mešanju ne smejo nastajati mehurčki).
- Po mešanju smo vsebino centrifugirali za 1 minuto pri sobni temperaturi, pri 13.000 obratih na minuto.

Pri delu z DNA mikromrežami smo upoštevali naslednje obvezne pogoje:

- Da bi se izognili poškodbam DNA mikromrež, jih zmeraj prijemamo z rokavicami (brez pudra), in sicer le na njihovih robovih. V nobenem primeru se ne smemo dotikati površine DNA čipov. Površina vsebuje vezane oligonukleotidne tarče, ki se lahko nepopravljivo poškodujejo.
- Tekom procesa hibridizacije moramo paziti, da se površina stekelc ne izsuši.
- Vse tarče znotraj vseh DNA mikromrež so natisnjene na tisto površino stekelc, ki vsebuje črtno kodo označeno z "Agilent". Ta stran stekelc se imenuje "aktivna" stran. "Ne-aktivna" stran stekelc je označena s številčno kodo.

### Šesti korak: Montaža hibridizacijske komore SureHyb (Agilent)

Montaža je potekala po naslednjih korakih:

- Najprej smo v komoro vstavili silikonsko tesnilo razdeljeno na 8 prekatov. Vsak prekat omogoči vodotesno okolico za eno od osmih DNA mikromrež na stekelcu.
- V posamezen prekat smo počasi odpipetirali po 40 µL cRNA vzorca (označeno in pomnoženo sondu). V vsak prekat smo vnesli drugo vzorčno cRNA.
- Nato smo počasi in previdno položili stekelce na tesnilo, in sicer tako, da je bila aktivna stran stekelca obrnjena navzdol proti tesnilu (tako smo s prekat v tesnilu vseh 8 DNA mikromrež izolirali drugo od druge). Pri tem smo pazili, da je bila stran stekelca s črtno kodo obrnjena navzdol (aktivna stran stekelca) in stran s številčno kodo obrnjena navzgor.
- Ko smo se prepričali, da se pozicija stekelca natanko ujema s pozicijo tesnila, smo na vrh komore položili tesnilni pokrov in ročno učvrstili objemke na obeh koncih komore.
- Nato smo komoro počasi obračali v navpični smeri, tako da se je 40 µL cRNA vzorca čim bolj razporedilo po površini celotnega prekata. Pri tem smo pazili, da ni prihajalo do nastanka mehurčkov.
- Takoj po obračanju smo komoro previdno vnesli v rotacijsko napravo, ki je bila vgrajena v hibridizacijsko pečico. Temperaturo v pečici smo naravnali na 65 °C. S pomočjo rotirajoče naprave se je komora vrtela okoli svoje osi z 10 obrati na minuto.
- Hibridizacija pri temperaturi 65 °C in 10 vrt je potekala natanko 17 ur.

### Sedmi korak: Priprava za spiranje DNA mikromrež

Najprej smo v pufer za spiranje številka 1 in v pufer za spiranje številka 2 vnesli 2 mL 10 % Tritona X-102 do končne koncentracije 0,005 %. Po pipetiranju smo oba kontejnerja za pufer 1 in 2 petkrat pretresli, da se je vsebina pufrov dobro premešala. Dodajanje Tritona X-102 ni obvezno, vendar je priporočljivo saj Triton X-102 učinkovito zmanjša možnost

nastajanja artefaktov na DNA mikromrežah tekom njihovega spiranja. 1000 mL pufra za spiranje 2 smo pretočili v sterilno enolitrsko steklenico z rdečim zamaškom, jo zatesnili in vsebino segrevali čez celo noč (pripravimo jo en dan pred spiranjem DNA čipov) v vodni kopeli pri 37 °C.

Priprava opreme za spiranje DNA mikromrež:

Za potek spiranja DNA mikromrež moramo imeti pripravljeno vso steklovino in orodja. Vse pladnje, stojala, mešala smo močno oprali z acetonitrilom in Milli-Q vodo. Postopek pranja je potekal tako:

Prvo pranje z acetonitrilom poteka po naslednjem postopku:

- Položi stojalo za stekelca in magnetno mešalo v pladenj za barvanje
- Prenesi pladenj na magnetno ploščo
- Napolni pladenj z 100 % acetonitrilom
- Vklopi magnetno mešalno ploščo in naravnaj hitrost na 20 vrt za 5 minut
- Odstrani acetonitril
- Posuši pladenj in vsebino pladnja v digestoriju.

Drugo pranje z Milli-Q vodo poteka po naslednjem postopku:

- Po steklovini in opremi polij velike količine Milli-Q vode
- Nato odstrani vso vodo, ki se je nabrala v steklovini in opremi
- Postopek polivanja in odstranjevanja Milli-Q vode ponovi vsaj 5-krat.

### Osmi korak: Spiranje stekelc z DNA mikromrežami

V preglednici 30 so predstavljeni koraki za postopek spiranja stekelc z DNA mikromrežami.

#### Preglednica 30: Potek spiranja stekelc z DNA mikromrežami.

Table 30: Protocol for washing slides containing DNA microarrays.

	Pladenj	Pufer za spiranje	Temperatura	Čas
Razstavljanje komore	1	GE Pufer za spiranje 1	25 °C	
Prvo spiranje	2	GE Pufer za spiranje 1	25 °C	1 min
Drugo spiranje	3	GE Pufer za spiranje 2	Povišana temperatura	1 min

Najprej smo prvi pladenj popolnoma napolnili z pufrom za spiranje 1. Nato smo v pladenj 2 položili stojalo za stekelca in magnetno mešalo. V pladenj 2 smo vlili toliko pufra za spiranje 1, da je pufer popolnoma preplavil stojalo za stekelca. Pladenj 2 smo nato položili na magnetno mešalno ploščo. Tudi v tretji pladenj smo položili magnetno mešalo in ga postavili na magnetno mešalno ploščo.

Po 17 urni inkubaciji smo odprli hibridizacijsko pečico in iz rotirajoče naprave sneli komoro. Nato smo razrahljali vijak za objemke z obračanjem v nasprotni smeri urnega kazalca. Ko so objemke popustile, smo jih odstranili iz komore in odprli pokrov komore. Nato smo iz baze komore z rokavicami odstranili silikonsko tesnilo s prekatimi. Potem smo stekelca in komoro potopili v pufer 1 v pladnju številka 1.

S pinceto smo previdno izvlekli stekelci (2 stekelci za 16 DNA mikromrež) in ju potopili v pladenj 2, ki je vseboval pufer 1. Ko smo jih potopili, smo obe stekelci previdno namestili na stojalo za stekelca in nadaljevali z 1- minutno inkubacijo na sobni temperaturi pri 6 vrt. Med inkubacijo smo v pladenj 2 vlili pufer 2, ki je bil predhodno segret na 37 °C.

Po inkubaciji smo prenesli stojalo s stekelcema v pladenj 3 in ju zopet inkubirali za 1 minutno pri 6 vrt. Nato smo počasi odstranili stojalo, pri čemer smo pazili na morebitne kapljice, ki bi lahko padle iz stojala na stekelca. Po spiranju je potrebno nemudoma lasarsko odčitati DNA mikromreže. Pri odlašanju lahko različni oksidanti vplivajo na signalne intenzitete. Stekelca smo samo za 5 minut postavili v oranžne PCV škatlice s tesnilom in jih zaprli, da ni prišlo do vdora dnevne svetlobe.

### **Deveti korak: Skeniranje DNA mikromrež in analiza pridobljenih podatkov**

Nastavitev za čitalec G2505B Microarray (Agilent) so predstavljene v preglednici 31.

#### **Preglednica 31: Nastavitev na čitalcu G2505B Microarray**

Table 31: Description of the necessary settings for the Microarray reader G2505B.

	<b>Za format stekelca 8x60K G3</b>
Barvni kanal	Zelen
Območje skeniranja	61 x 21,6 mm
Resolucija skeniranja ( $\mu\text{m}$ )	3
Format slike	20 bit

Ekstrakcija podatkov iz skeniranih slik DNA mikromrež je potekala s pomočjo programske opreme Agilent Feature (FE, Agilent). Znotraj programske opreme smo lahko identificirali točke sond, izločili intenzitete ozadja slike in kvantificirali vse fluorescentne signale. Surove podatke fluorescentnih signalov pridobljene iz skeniranja 16 DNA mikromrež (8 za fermentacije s čistimi kulturami in 8 za fermentacije z membransko ločenimi kulturami) smo deponirali v spletno banko transkriptomskih podatkov GEO (Gene Expression Omnibus), in sicer pod pristopno številko GSE38582.

### **Deseti korak: Filtracija surovih podatkov in analiza transkriptomskih podatkov**

Spolne popravke fluorescentnih signalov v ozadju in filtracijo podatkov smo izvedli z uporabo programske opreme BRB (Biometric Research Branch)-ArrayTools V4.2 (Simon in sod., 2007). Vse fluorescentne signale smo nato logaritmirali z osovo 2 in izračunali povprečja vseh tistih sond, ki so bile večkrat natisnjene na stekelce. Z namenom zmanjša sistematične variance smo podatke normalizirali glede na njihovo celokupno mediano znotraj celotne DNA mikromreže.

Transkripte, ki so se izražali statistično različno tekom fermentacij s čistimi in membransko ločenimi kulturami, smo določili z uporabo dvorazrednega neparnega testa SAM (»Ang«: Significance Analysis for Microarrays) (Tusher in sod., 2001). Pri tem smo z 90 % zaupanja upoštevali naslednje pogostnosti lažnih odkritij (Ang: »False Discovery Rate« FDR) (Genovese in sod., 2002): in sicer za vzorčenje po 22 urah fermentacije je bila FDR 3,1 %, za vzorčenje po 92 urah je bila FDR 5,8 %, za vzorčenje po 144 urah je bila FDR 4,1 % in za vzorčenje po 187 urah je bila FDR 7,2 %. Pri izboru diferencialno izraženih genov smo upoštevali minimalno 2-kratno spremembo v ekspresiji genov. Če so transkripti kazali manjšo spremembo od 2-kratne spremembe, teh transkriptov nismo upoštevali. Diferencialno izražene transkripte smo razporedili v skupine glede na njihovo izražanje v štirih časovnih točkah fermentacije. Transkripti s podobnim vzorcem izražanja skozi čas fermentacije so bili avtomatično razporejeni v skupno skupino z algoritmom CLICK (pri p-vrednosti 0,05). Nadalje smo z algoritmom TANGO (pri p-vrednosti 0,05) avtomatično pripisali gensko ontologijo (biološki proces) vsem transkriptom razporenim v skupine in jih znotraj določene skupine glede na njihovo biološko funkcijo razporedili v pod skupine. Oba omenjena algoritma sta na voljo v programskem paketu Expander 4.1 (Expression Analyzer and Displayer) (Shamir in sod., 2005).

### **3.2.2 Vpliv prekurzorskih molekul, etanola, in različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* na proizvodnjo hlapnih fenolov v mešanih fermentacijah s kvasovko *S. cerevisiae***

V tem tematskem sklopu smo želeli preučiti vpliv prekurzorskih molekul, etanola, in različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* na produkcijo hlapnih fenolov v fermentacijah s čisto in mešano kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Pri teh poskusih nas je zanimalo tudi izražanje genov, ki kodirajo encime za sintezo hlapnih fenolov v kvasovkah *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*.

#### **3.2.2.1 Vpliv prekurzorskih molekul v fermentacijah z mešanimi in čistimi kulturami**

Namnoženo biomaso *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae* smo centrifugirali pri 1500x g za 5 min, jo resuspendirali v 10 mL umetnega mošta MS300 in pod Bürker-Türkovo števno ploščico določili število celic. Inokulum smo inokulirali v 200 mL umetnega mošta MS300 do končne koncentracije  $1 \times 10^6$  celic/mL. Inokulacije in fermentacije v 250 mL erlenmajericah so potekale po postopkih opisanih v poglavjih 3.2.1.2; 3.2.1.3 in 3.2.1.4.

Pri teh poskusih smo v začetku priprave fermentacij v 9 erlenmajeric odpipetirali skupno založno raztopino HCK pripravljeno iz 1 g p-kumarne in 1 g ferulne kisline, ki smo ju skupaj raztopili v 14 mL absolutnega etanola (71,4 g/L). Končno koncentracijo HCK smo naravnali na 50 mg/L p-kumarne (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 50 mg/L ferulne kisline (100 mg/L HCK v celoti na eno fermentacijo). Tri erlenmajerice smo uporabili za inokulacijo s kvasovko *S. cerevisiae* (EC1118), naslednje tri za inokulacijo s kvasovko *D. bruxellensis* (ZIM 701) in zadnje tri za inokulacijo z obema kvasovkama hkrati.

V isti seriji poskusov smo testirali še vpliv zamenjave prekurzorskih molekul HCK z vinilfenolnimi prekurzorji. Zamenjavo smo izvedli tako, da smo v začetku priprave fermentacij v 9 erlenmajeric namesto *p*-kumarne in ferulne kisline odpipetirali skupno založno raztopino 4-vinilfenola in 4-vinilgvajakola (Sigma-Aldrich, Nemčija). Skupna končna koncentracija obeh vinilfenolov je znašala 100 mg/L (50 mg/L 4-vinilfenola in 50 mg/L 4-vinilgvajakola). Od devetih erlenmajeric smo tri uporabili za inokulacijo s kvasovko *S. cerevisiae* (EC1118), naslednje tri za inokulacijo s kvasovko *D. bruxellensis* (ZIM 701) in zadnje tri za inokulacijo z obema kvasovkama hkrati.

Za vseh 18 fermentacij smo po 22, 67, 92, 140, 200 in 234 urah inkubacije določali število kolonij na ploščah in pa absolutno spremembo v gostoti mošta. Vzorčenje za določanje hlapnih fenolov z analizo HPLC smo izvajali pri enakih časih. Vzorčenje za izolacijo celokupne RNA za analizo RČ PCR smo izvajali po 50 urah fermentacije.

### 3.2.2.2 Vpliv etanola v fermentacijah z mešanimi in čistimi kulturami

Inokulum in fermentacije smo pripravili po navodilih v poglavjih 3.2.1.2; 3.2.1.3 in 3.2.1.4. Pri teh poskusih smo v začetku priprave fermentacij v 9 erlenmajeric odpipetirali absolutni etanol v končni koncentraciji 2,5 % (v/v). V naslednjih 9 erlenmajeric smo odpipetirali absolutni etanol v končni koncentraciji 5 % (v/v) in v zadnjih 9 erlenmajeric v končni koncentraciji 10 % (v/v).

Umetni mošt MS300 je za vseh 27 fermentacij vseboval enako koncentracijo HCK, in sicer 10 mg/L *p*-kumarne in 10 mg/L ferulne kisline (skupaj 20 mg/L HCK na eno fermentacijo). Za nižjo koncentracijo HCK smo se odločili zaradi poznanih negativnih vplivov ferulne kisline na rast kvasovk, še zlasti v prisotnosti etanola (Harris in sod., 2008).

Za vsako končno koncentracijo etanola v umetnem moštu MS300 (9 erlenmajeric na koncentracijo) smo uporabili po tri erlenmajerice za inokulacijo s kvasovko *S. cerevisiae* (EC1118), naslednje tri za inokulacijo s kvasovko *D. bruxellensis* (ZIM 701) in zadnje tri za inokulacijo z obema kvasovkama hkrati. Vse inokulacije so bile izvedene po navodilih v poglavju 3.2.1.2.

Za vseh 27 fermentacij smo po 22, 67, 92, 140, 200 in 234 urah inkubacije določali število kolonij na ploščah in pa absolutno spremembo v gostoti mošta. Vzorčenje za določanje hlapnih fenolov z analizo HPLC smo izvajali pri enakih časih. Vzorčenje za izolacijo celokupne RNA za analizo PCR-RČ smo izvajali po 50 urah fermentacije.

### 3.2.2.3 Vpliv raznolikosti sevov kvasovke *D. bruxellensis* v fermentacijah z mešanimi in čistimi kulturami

Inokulum in fermentacije smo pripravili po navodilih v poglavjih 3.2.1.2; 3.2.1.3 in 3.2.1.4. Pri teh poskusih smo v začetku priprave fermentacij v vse erlenmajerice odpipetirali skupno založno raztopino HCK (*p*-kumarne in ferulne kisline). Končna

koncentracija *p*-kumarne in ferulne kisline je znašala 50 mg/L (100 mg/L HCK v celoti na eno fermentacijo).

Od vseh 250 mL erlenmajeric, ki smo jih uporabili v tem poskusu, smo samo tri erlenmajerice z umetnim moštom MS300 inokulirali s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae* (EC1118). Vpliv seva ZIM 2512 kvasovke *D. bruxellensis* smo preučili tako, da smo po 3 erlenmajerice z umetnim moštom MS300 inokulirali s čisto kulturo seva ZIM 2512, naslednje tri pa z mešano kulturo kvasovk *S. cerevisiae* (EC1118) in ZIM 2512. Po enakem postopku smo preučili vpliv vseh naslednjih sevov kvasovke *D. bruxellensis*: ZIM 700, ZIM 702, ZIM 703, ZIM 704, ZIM 706, ZIM 1764, ZIM 2306, ZIM 1762 in CBS 2499. Za vseh 63 fermentacij smo po 22, 67, 92, 140, 200 in 234 urah inkubacije določali število kolonij na ploščah in absolutno spremembo v gostoti mošta. Vzorčenje za določanje hlapnih fenolov z analizo HPLC smo izvajali pri enakih časih.

### 3.2.2.4 Ali je kvasovka *D. bruxellensis* sposobna privzemati glicerol?

V tem poskusu smo želeli preveriti ali kvasovka *D. bruxellensis* lahko privzema glicerol iz umetnega mošta MS300. Inokulum in fermentacije smo pripravili po navodilih v poglavjih 3.2.1.2; 3.2.1.3 in 3.2.1.4. Za razliko od običajnih fermentacij smo v gojišče inokulirali le kvasovko *D. bruxellensis* (ZIM 701) v čisti kulturi, in sicer v šest 250 mL erlenmajeric v končni koncentraciji  $1 \times 10^6$  celic/mL. V tem poskusu nismo uporabili kvasovke *S. cerevisiae*. Inkubacija je potekala 250 ur, in sicer v umetnem moštu MS300, ki ni vseboval glukoze in fruktoze marveč 10 g/L glicerola (99,98 %, Sigma). Poskus je bil izveden v treh erlenmajericah (tri paralelke). Vzorčenje za določitev koncentracije glicerola z metodo HPLC smo naredili po 22, 67, 92, 140, 200 in 234 urah inkubacije.

### 3.2.2.5 Merjenje izražanja genov z analizo PCR-RČ

Izolacija celokupne RNA je potekala po postopku opisanem v poglavju 3.2.1.10. Po izolaciji smo izmerili koncentracijo celokupne RNA, preverili kvaliteto celokupne RNA, naredili obratni prepis molekule RNA v molekulo cDNA, konstruirali začetne oligonukleotide in izvedli reakcije pomnoževanja v aparaturi ABI PRISM™ 7500 Sequence Detection System.

#### 3.2.2.5.1 Merjenje koncentracije celokupne RNA

Koncentracijo RNA smo izmerili s spektrofotometrom Lambda Bio (Perkin Elmer), in sicer z merjenjem valovne dolžine pri 260 nm (vrednost 1 ( $A_{260}$ ) je sorazmerna z 40 µg/mL celokupne RNA). Za korekcijo ozadja smo morali najprej spektrofotometer umeriti s slepim vzorcem (samo ddH<sub>2</sub>O). Nato smo na kiveto odpipetirali 1,5 µL vzorca in kiveto pokrili s pokrovčkom.

#### 3.2.2.5.2 Preverjanje kvalitete in čistosti RNA z agarozno gelsko elektroforezo

Morebitno razgrajenost in čistost celokupne molekule RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Vzorce molekule RNA smo najprej denaturirali z inkubacijo v termalni aparaturi PCR (GeneAmp DNA Thermal Cycler 2400, Perkin Elmer) pri 70 °C za

10 minut. Z denaturiranjem preprečimo morebiten nastanek sekundarnih struktur, ki nastanejo z medmolekulskim parjenjem baz in lahko ovirajo migracijo RNA molekule na agaroznem gelu. Po denaturaciji smo vzorce za 5 minut ohladili na 0 °C. Vse sestavne dele elektroforezne kadičke, nosilec gela in glavniček za pripravo žepkov v gelu smo sprali z 0,5 % SDS in nato še z ddH<sub>2</sub>O. Prisotnost 18S in 25S ribosomalnih RNA (Valenzuela in sod., 1977; Li in sod., 2009; Aranda in sod., 2012) in morebitno okužbo z genomsko DNA smo preverili na 1,5 % agaroznem gelu. Za pripravo gela smo 1 g agaroze raztopili v 60 mL 0,5x TAE pufra. Mešanico smo dobro raztopili s segrevanjem v mikrovalovni pečici in jo ohladili ter ji dodali 6 µL fluorescenčnega barvila Syber safe (Invitrogen). Vsebino smo nato vlili v nosilec za agarozni gel.

Pred nanosom RNA vzorcev na gel smo v 5 µL vzorca dodali 5 µL RNA nanašalnega pufra (Fermentas). Nato smo 8 µL mešanice vzorca in pufra odpipetirali v vdolbinice agaroznega gela. Elektroforeza je potekala pri napetosti 80 V in je trajala okoli 60 minut. Po elektroforezi smo gel slikali z UV transiluminatorjem Gel Doc (Biorad). Kontrast slik smo prilagodili s programsko opremo Quantity One v4.2.3 (Biorad). Rezultati analize kakovosti celokupne RNA v vzorcih so predstavljeni v prilogi F.

### 3.2.2.5.3 Obratni prepis RNA molekule v molekulo cDNA

Encim reverzna transkriptaza v mešanici SuperScript® katalizira prepis enoverižne molekule RNA v komplementarno molekulo cDNA. Na ta način sintetiziramo bolj stabilno molekulo cDNA (v primerjavi s nestabilno in lahko razgradljivo molekulo RNA), ki jo lahko potem takem uporabimo za metodo PCR-RČ. Reverzni prepis smo izvedli s komercialnim kompletom SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis, ki vsebuje mešanico za sintezo prve verige molekule cDNA. Za prepis smo pripravili 20 µL reakcijske mešanice, ki je vsebovala 4 µL 5× reakcijske mešanice VILO™ in 2 µL 10× encimske mešanice SuperScript®. Volumen dodajanja celokupne RNA je bil odvisen od koncentracije RNA. Ta je bila normirana in z redčitvami v ddH<sub>2</sub>O naravnana na končno koncentracijo 50 mg/L RNA v reakcijski mešanici. Reakcijske mešanice smo pripravili v mikrocentrifugirkah in jih inkubirali v aparaturi za PCR pod naslednjimi pogoji: 10 minut pri sobni temperaturi, 60 minut pri 42 °C in 5 minut pri 85 °C. Po prepisu smo cDNA vzorce shranili pri temperaturi -20 °C.

### 3.2.2.5.4 Konstrukcija začetnih oligonukleotidov

V poskusih smo spremljali izražanje tarčnih genov *FDC1*, *PADI*, *KKD*, *VPR*. Njihovo izražanje je bilo normalizirano glede na hišne gene *ACT1* (Kreuzer in sod., 1999), 18S rRNA (Paule in White, 2000) in *TEF1* (Nardi in sod., 2010) za obe vrsti kvasovk posebej. Začetne oligonukleotide smo konstruirali z računalniškim programom Primer 3 (Rozen in Skaletsky, 2000). V programu smo v analizno okence vnesli celotne oligonukleotidne sekvence tarčnih ali hišnih genov. Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov nismo spremenjali nastavitev, ki so bile že vnaprej predlagane v programske opremi. Te so bile naslednje:

- Optimalna dolžina: med 18 in 27 z optimumom pri 20 nukleotidih
- Delež nukleotidov G in C: med 20 in 80 % z optimumom pri 50 %

- $T_m$  oligonukleotidnih začetnikov: med 57 in 63 z optimumom pri 60 °C
- Dolžina pomnožka (amplikona): od 100 do 150 bp

### 3.2.2.5.5 Relativne standardne krivulje za tarčne in hišne gene kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*

Relativne standardne krivulje smo izdelali za vsak gen z namenom lažje kvantifikacije specifičnega pomnožka znotraj cDNA vzorca. Za izdelavo krivulje smo serijsko redčili enega od cDNA vzorcev kvasovke *S. cerevisiae* ali *D. bruxellensis*. V treh paralelkah smo pripravili naslednje 5-kratne redčitve: 0,2; 0,04; 0,008; 0,0016. Pri tem smo vzorec cDNA redčili z ddH<sub>2</sub>O. Redčitveno krivuljo smo narisali na grafu, kjer smo na x os postavili log<sub>10</sub> vrednosti tarčnega zaporedja, na y os pa C<sub>T</sub> vrednosti. Na podlagi redčitvene krivulje smo določili koncentracijo cDNA vzorca. Najbolj optimalna koncentracija je bila definirana znotraj tistega intervala, v katerem je linearna krivulja kazala naklon blizu -3,3. Znotraj tega intervala je učinkovitost pomnoževanja nekje med 90 % in 105 %, kar pomeni, da se takrat vsaka kopija gena pomnoži v točno dve novi kopiji. Učinkovitost pomnoževanja (E) lahko izračunamo iz naklona krivulje (S), in sicer po naslednji enačbi:

$$E = 10^{(1/S)} - 1 \quad (17)$$

Relativne standardne krivulje za vse obravnavane gene obeh vrst kvasovk so predstavljene v prilogah od C1 do C10.

### 3.2.2.5.6 Priprava reakcijskih mešanic za analizo PCR-RČ

Metoda PCR v realnem času meri produkt v eksponentni fazи, ko je pomnoževanje DNA še učinkovito. Meritve pomnožka so sorazmerne s količino cDNA (Higuchi in sod., 1993), zato nam metoda omogoča kvantifikacijo cDNA molekul znotraj določenega biološkega vzorca. Pomnožke smo merili s pomočjo fluorescenčnih barvil (Valasek in Repa, 2005), ki se vsakič znova vgradijo v na novo pomnožene vijačnice molekule cDNA. Vgradnja barvila je mogoča le ob procesu podvojevanja cDNA verige. Posledično nam v primerjavi z gelsko elektroforezo, omogoča bistveno natančnejšo detekcijo pomnoženih produktov.

PCR-RČ reakcije smo izvedli v optičnih ploščicah z 96 vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 10 µL mešanice SyBR GreenER (universal), 1 µL začetnega (do končne koncentracije 50 nM) in 1 µL končnega oligonukleotida (do končne koncentracije 50 nM), 0,4 µL pasivnega referenčnega barvila ROX in 2 µL ustrezno redčene vzorčne cDNA. V vsako reakcijo smo do končnega volumna 20 µL dodali še vodo brez nukleaz (Fermentas). Morebitno okužbo reakcijske mešanice smo preverili tako, da smo v tri vdolbine namesto cDNA vzorca dodali vodo brez nukleaz (Fermentas).

Po pipetiranju in pripravi reakcij smo optično ploščico zatesnili z optično adhezivno folijo (ABI PRISM Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems) in celotno ploščico na hitro centrifugirali (800x g za 0,5 min). PCR-RČ pomnoževanje je potekalo na aparaturi ABI PRISM™ 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Pomnoževanje je potekalo pod naslednjim temperaturno-časovnim programom:

- 50 °C, 2 minuti
- 95 °C, 2 minuti
- 40 obratov: 95 °C, 15 sekund  
60 °C, 1 minuta

Na koncu smo na aparaturi ABI PRISM™ 7500 izvedli še denaturacijo s temperaturnim intervalom od 60 °C do 95 °C, pri čemer se je za vsak pomnožek posebej izrisala denaturacijska krivulja.

### 3.2.2.5.7 Analiza rezultatov pridobljenih z metodo PCR-RČ

Tako po analizi PCR-RČ je sledila avtomatična analiza surovih podatkov s programsko opremo SDS 2.3 (Applied Biosystems). Program je fluorescenčni signal izračunal kot:

Rn<sup>+</sup> ...emisija fluorescence produkta  
Rn<sup>-</sup> ...emisija referenčnega barvila ROX

$$\Delta Rn = Rn^+ - Rn^- \quad (18)$$

Izračunane fluorescenčne signale ( $\Delta Rn$ ) je program predstavil v odvisnosti od števila ciklov PCR reakcij v tako imenovanem grafu pomnoževanja. Graf pomnoževanja je sestavljen prvič iz bazne linije (fluoresanca pomnožka ne presega več signala ozadja), drugič iz eksponentne faze (intenziteta fluorescence linearno narašča) in tretjič iz plato faze (fluoresanca doseže zgornji plato). Dodatno program v eksponentni fazi avtomatično določi prag izražanja fluorescentnega signala. Po izrisu pomnoževanja je program za vsoko posamezno reakcijo PCR pomnoževanja določil vrednost  $C_T$  (angleško: »cycle threshold«). Ta vrednost je definirana kot število ciklov PCR pomnoževanja določenega pomnožka, ki so potrebni za dosego definiranega praga fluorescenčnega signala (Wilhelm in Pingoud, 2003).

Stopnjo izražanja tarčnih genov je potrebno korigirati glede na izražanje hišnih genov (Vandesompele in sod., 2002). V naših poskusih smo se odločili za normalizacijo glede na tri gene, ki se v poskusih najpogosteje uporabljajo kot referenčni oziroma hišni geni. To so elongacijski faktor (Tef1p), aktin (Act1p) in 18S rRNA. Izražanje hišnih genov smo posebej spremljali pri kvasovkah *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Izražanje tarčnih genov in normalizacijo izražanja teh genov glede na hišne gene smo izvedli z računalniškim programom REST® (angleško »relative expression software tool«), ki so ga razvili Pfaffl in sod. (2002). Uporabljeni program je sposoben normalizirati izražanje tarčnih genov glede na izražanje večjega števila hišnih genov.

Po naslednji enačbi program izračuna povprečno absolutno koncentracijo za vsak gen posebej:

$$\text{Konc.}_{\text{gena}} = \text{efektivnost}^{(\text{povp(kontrol)} - \text{povp(vzorcev)})} \quad (19)$$

$$\text{Konc}_{\text{hiš. gena } 1} = \text{Ct}_{\text{hiš. gena } 1} \quad (20)$$

Program izračuna izražanje tarčnega gena glede na izražanje vseh hišnih genov hkrati. Pri tem upošteva geometrično povprečje koncentracij vseh obravnavanih genov (tarčnega gena in vseh hišnih genov):

$$\text{Izražanje}_{\text{tar. gena}} = \frac{\text{Konc}_{\text{tar. gena}}}{\text{Geo. povp.}(\text{Konc}_{\text{hiš. gena } 1}, \text{Konc}_{\text{hiš. gena } 2}, \dots)} \quad (21)$$

Z upoštevanjem izražanja hišnih genov nam program omogoča, da se lahko izognemo morebitnim razlikam v izražanju tarčnih genov, ki lahko nastanejo zaradi razlik v procesu izolacije RNA, zaradi razlik v obratnem prepisu v cDNA in zaradi razlik v pomnoževanju cDNA molekule. Za hišne gene so bili izbrani tisti transkripti za katere velja, da imajo stabilno izražanje ne glede na biološki vzorec in stadij poskusa, iz katerega so izolirani (Vandesompele in sod., 2002).

## 4 REZULTATI

V poglavju so opisani rezultati, ki smo jih pridobili pri eksperimentalnem delu. Rezultati so razdeljeni na dva sklopa glede na dve raziskovalni hipotezi, in sicer na vpliv membransko ločenih fermentacij na sintezo in akumulacijo aromatskih snovi ter na vpliv prekurzorskih molekul, etanola in različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* na sintezo hlapnih fenolov med mešanimi fermentacijami.

### 4.1 VPLIV KVASOVKE *D. bruxellensis* NA METABOLIZEM KVASOVKE *S. cerevisiae* IN NA KONČNO AROMO VINA V MEMBRANSKO LOČENIH KULTURAH

V prvem delu so predstavljeni rezultati vpliva kvasovke *D. bruxellensis* na rast, na absolutno spremembo v gostoti mošta in na metabolizem aromatskih snovi kvasovke *S. cerevisiae*. Testne fermentacije z mešanima kulturama teh dveh vrst kvasovk smo inokulirali v membranske bioreaktorje v obliki ločenih kultur. Nadalje smo predstavili rezultate vpliva membransko ločenih kultur na nastanek celotnega aromatskega profila vina in na izražanje genoma kvasovke *S. cerevisiae*.

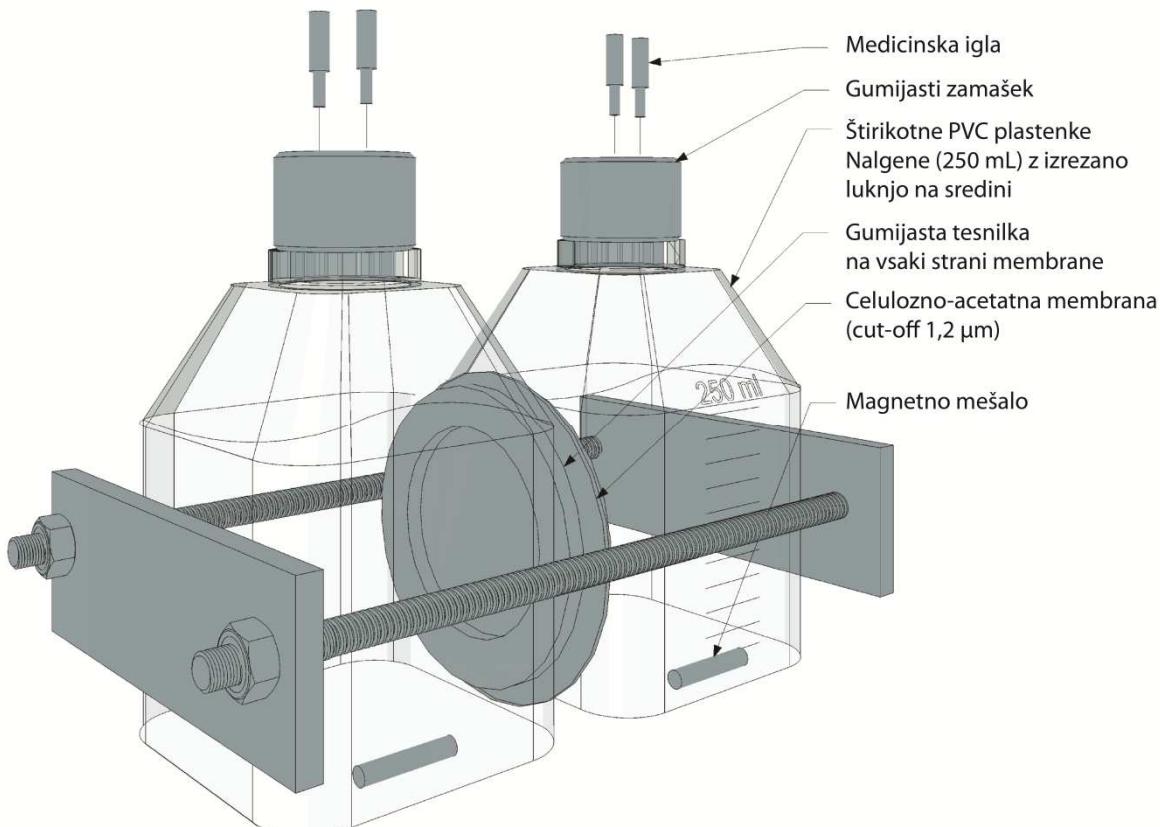
#### 4.1.1 Preskušanje membranskega bioreaktorja

Membranski bioreaktor, ki smo ga uporabili za membransko ločene in čiste kulture kvasovk *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae* je predstavljen na sliki 3. Slika 5 prikazuje rezultate fermentacijske kinetike čistih kultur kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* inokuliranih v določeno stran znotraj membranskega bioreaktorja, v primerjavi s kinetiko membransko ločenih kultur kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* (simulacija mešane fermentacije, pri čemer sta obe vrsti kvasovk med seboj fizično ločeni z membrano), ki so bile prav tako izvedene v membranskih bioreaktorjih. V primeru membransko ločenih kultur smo eno stran membrane inokulirali s kvasovko *S. cerevisiae* drugo stran pa s kvasovko *D. bruxellensis*.

Da bi preverili uporabnost in primernosti membranskih bioreaktorjev za izvajanje fermentacij s čisto in mešano kulturo, smo biosintezo etanola, glicerola, glukoze, fruktoze in hlapnih fenolov v membranskih bioreaktorjih primerjali z njihovo proizvodnjo v fermentacijah izvedenih v posameznih 250 mL erlenmajericah. Fermentacije, ki smo jih izvedli v erlenmajericah z obema vrstama kvasovk smo poimenovali mešane fermentacije, saj sta bili obe vrsti kvasovk v teh fermentacijah med seboj pomešani v istem volumnu. V primeru uporabe membranskih bioreaktorjev pa sta bili obe vrsti ločeni z membrano, zato smo te fermentacije poimenovali kot membransko ločene fermentacije.

Kot je prikazano na sliki 5, fizična osamitev celic ni imela vpliva na splošno fermentacijsko kinetiko porabe glukoze in fruktoze ali nastajanja etanola ter glicerola. Poleg tega je bila proizvodnja hlapnih fenolov 4-VF, 4-VG, 4-EF ali 4-EG v membranskih bioreaktorjih podobna proizvodnji, ki je potekala v 250 mL erlenmajericah (slika 8). V obeh primerih smo uporabili 50 mg/L ferulne in 50 mg/L kumarne kisline (skupaj 100 mg/L HCK). Na podlagi teh rezultatov smo se odločili za uporabo membranskega

bioreaktorja za preučevanje vpliva kvasovke *D. bruxellensis* na transkriptom kvasovke *S. cerevisiae* in na aromatični profil fermentiranega vina.



**Slika 3: Shematski prikaz membranskega bioreaktorja sestavljenega iz dveh predelov.**  
Figure 3: Schematic representation of the double-compartment membrane system.

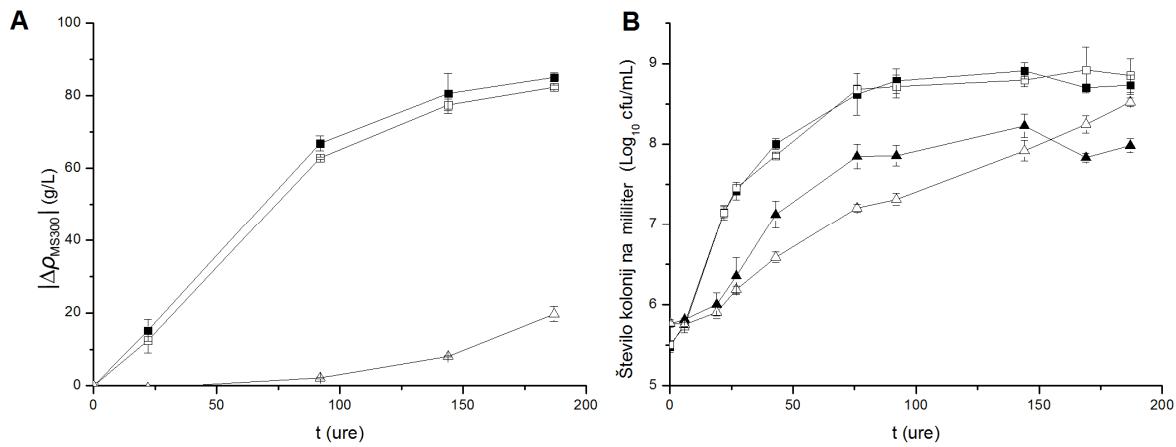
#### 4.1.1.1 Rast kvasovk in fermentacijska kinetika v membranskih bioreaktorjih in erlenmajericah

Rastne krivulje kvasovk, absolutne spremembe v gostoti mošta, poraba sladkorjev in tvorba alkoholov so ostali približno enaki tako v fermentacijah izvedenih v membranskih bioreaktorjih (slika 4) kot v fermentacijah izvedenih v erlenmajericah (slika 7). To je veljalo tako za mešane (ozioroma za membransko ločene v primeru membranskega bioreaktorja) kot za čiste kulture obeh vrst kvasovk. V naslednjem odstavku so predstavljeni skupni rezultati rastnih krivulj, absolutnih sprememb v gostoti mošta, porabe sladkorjev in tvorbe alkoholov v membranskih bioreaktorjih in v erlenmajericah.

Kvasovka *S. cerevisiae* je v prisotnosti 100 mg/L HCK dosegla okoli  $8,6 \log_{10}$ CFU/mL ne glede na to ali je šlo za mešane (ozioroma za membransko ločene v primeru uporabe membranskega bioreaktorja) ali čiste kulture (slika 4, 7a in 7c). Enako je veljalo tudi v primeru merjenja končnih absolutnih sprememb v gostoti mošta (t.j. približna vrednost za koncentracijo CO<sub>2</sub>, ki se je sprostila iz sistema), pri čemer so za oba načina inkubacije le te znašale okoli 83 g/L. Potemtakem prisotnost kvasovke *D. bruxellensis* v mešanih fermentacijah ni vplivala na kinetiko rasti kvasovke *S. cerevisiae* (slika 4b, 7a in 7c).

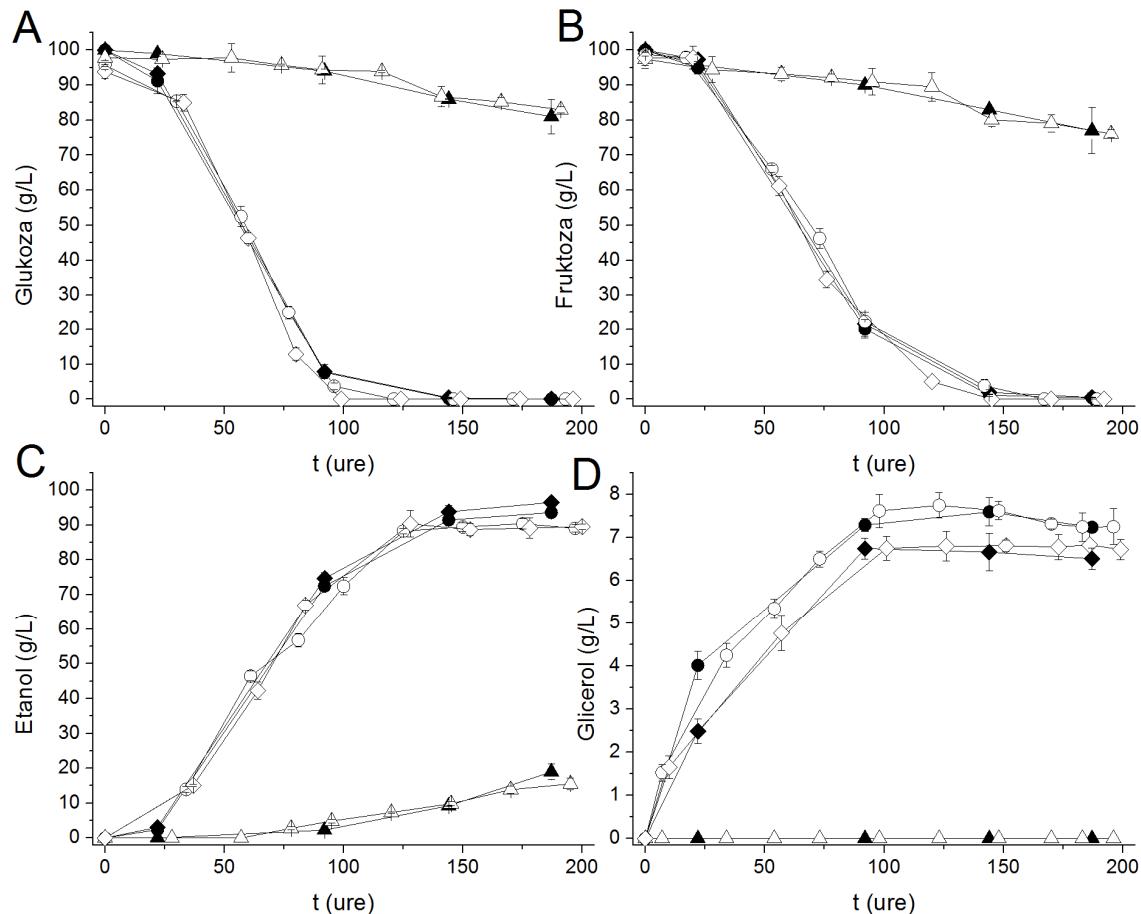
V čistih fermentacijah je rast kvasovke *D. bruxellensis* dosegla okoli  $8,5 \log_{10}$ CFU/mL, v mešanih fermentacijah (ozziroma v membransko ločenih fermentacijah v primeru uporabe membranskega biorekatorja) pa okoli  $8,0 \log_{10}$ CFU/mL (slika 4, 7b in 7c). Ne glede na vrsto inkubacije smo opazili, da je bila rastna krivulja kvasovke *D. bruxellensis* v eksponentni fazi za  $0,5 \log_{10}$ CFU/mL večja v mešanih kulturah (ozziroma v membransko ločenih kulturah v primeru uporabe membranskega biorekatorja) v primerjavi s čistimi kulturami te kvasovke. Z drugimi besedami, njena rast je po 50 urah inkubacije v mešani kulturi dosegla okoli  $7,0 \log_{10}$ CFU/mL, v čisti kulturi pa okoli  $6,5 \log_{10}$ CFU/mL. Faza rasti kvasovke *D. bruxellensis* je v čisti kulturi trajala kar 160 ur, pri čemer je po koncu inkubacije absolutna sprememba v gostoti mošta znašala okoli 20,0 g/L (slika 4a in 7b).

Ne glede na to ali smo fermentacije izvedli v membranskih bioreaktorjih ali v erlenmajericah so bile kinetike porabe fruktoze in glukoze ter kinetike produkcije etanola in glicerola podobne (slika 5). V primeru mešanih (ozziroma membransko ločenih v primeru uporabe membranskega biorekatorja) kot čistih kultur kvasovke *S. cerevisiae* je po 150 urah inkubacije prišlo do popolne porabe glukoze in fruktoze. V čistih kulturah s kvasovko *D. bruxellensis*, je po 200 urah inkubacije v gojišču še vedno ostalo 78 g/L fruktoze in 85 g/L glukoze. Končna koncentracija etanola je v mešanih kulturah (ozziroma v membransko ločenih kulturah v primeru uporabe membranskega biorekatorja) dosegla 96,5 g/L, v čistih kulturah kvasovke *S. cerevisiae* 93,6 g/L in v čistih kulturah kvasovke *D. bruxellensis* 18,9 g/L. Kvasovka *D. bruxellensis* v čisti kulturi ni proizvajala glicerola. V čisti kulturi kvasovke *S. cerevisiae* je po koncu inkubacije nastalo 7,2 g/L glicerola, v mešani fermentaciji (ozziroma v membransko ločeni fermentaciji v primeru uporabe membranskega biorekatorja) pa 6,5 g/L glicerola. Da bi nakazali ali je sev ZIM 701 (*D. bruxellensis*) v resnici sposoben privzemati glicerol, ki ga je v mešanih fermentacijah akumulirala kvasovka *S. cerevisiae*, smo ta sev inokulirali v minimalno gojišče, ki je vsebovalo glicerol kot edini vir ogljika. Rezultati so pokazali, da je sev ZIM 701 po 241 urah inkubacije v čisti kulturi porabil 0,85 g/L glicerola (slika 6).



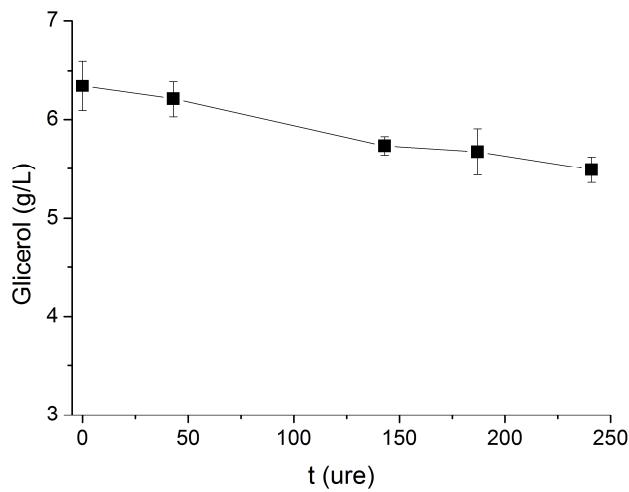
**Slika 4:** Absolutna sprememba gostote mošta ( $|\Delta\rho_{MS300}|$ ) (A) in rastna krivulja (B) kvasovk *S. cerevisiae* (■, □) in *D. bruxellensis* (▲, △) v čistih fermentacijah (odprtih simboli) in v fermentacijah ločenih z membrano (polni simboli). Tako čiste kot z membrano ločene fermentacije smo izvedli v membranskih bioreaktorjih. Vse fermentacije so bile izvedene v umetnem moštu MS300 dopoljenem s 100 mg/L HCK.

Figure 4: Absolute change in must density ( $|\Delta\rho_{MS300}|$ ) (A) and the growth curve (B) of *S. cerevisiae* (■, □) and *D. bruxellensis* (▲, △) pure (open symbols) and membrane-separated (filled symbols) culture fermentations performed in double-compartment membrane systems. All fermentations were performed in synthetic must MS300 containing 100 mg/L of HCK.



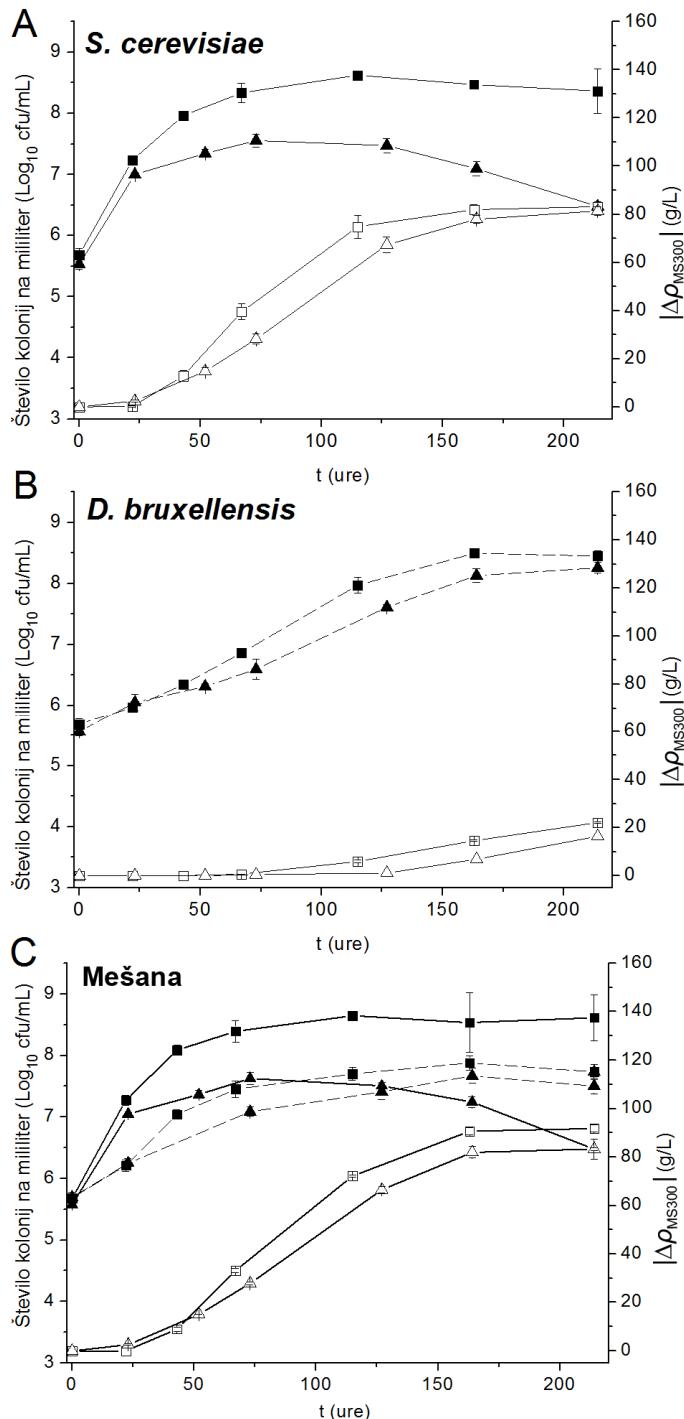
**Slika 5:** Fermentacijska kinetika fermentacij izvedenih v membranskih bioreaktorjih (polni simboli) in v 250 mL erlenmajericah (odprtji simboli). Fermentacije, ki smo jih izvedli v erlenmajericah z obema kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* smo poimenovali mešane fermentacije, tiste, ki pa smo jih izvedli v membranskih bioreaktorjih pa smo poimenovali membransko ločene fermentacije. Simboli: čista kultura kvasovke *S. cerevisiae* (●, ○), čista kultura kvasovke *D. bruxellensis* (▲, △) in mešane kulture (oziroma z membrano ločene kulture v primeru uporabe membranskega bioreaktorja) (◆, ◇). (A) Poraba glukoze, (B) poraba fruktoze, (C) proizvodnja etanola in (D) proizvodnja glicerola. Vse fermentacije so bile izvedene v umetnem moštu MS300 dopoljenem s 100 mg/L HCK.

Figure 5: Comparing the fermentation kinetics of fermentations performed in double-compartment membrane systems (filled symbols) with those performed in regular Erlenmeyer flasks (open symbols). Fermentations, which were carried out in Erlenmeyer flasks with both yeasts *S. cerevisiae* and *D. bruxellensis* were called mixed fermentations, and the ones that were carried out in membrane bioreactors were called membrane-separated fermentations. Symbols: *S. cerevisiae* pure (●, ○), *D. bruxellensis* pure (▲, △) and mixed culture fermentations (or membrane-separated culture fermentations in the case of using a membrane bioreactor) (◆, ◇). (A) Glucose utilization, (B) fructose utilization, (C) ethanol production and (D) glycerol production. All fermentations were performed in synthetic must MS300 containing 100 mg/L of HCK.



**Slika 6: Prevzem glicerola s kvasovko *D. bruxellensis*.** Čista kultura kvasovke *D. bruxellensis* inokulirana v umetni mošt MS300, ki je vseboval 10 g/L glicerola, ni pa vseboval glukoze in fruktoze. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah. Podrobni opis poskusa se nahaja v podpoglavlju 3.2.2.4.

Figure 6: The utilization of glycerol by *D. bruxellensis*. Pure culture of yeast *D. bruxellensis* inoculated into an artificial must MS300, which was supplemented with 10 g/L of glycerol, but did not contain the sugars glucose and fructose. Fermentations were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks. Detailed description of the experiment is located in section 3.2.2.4.



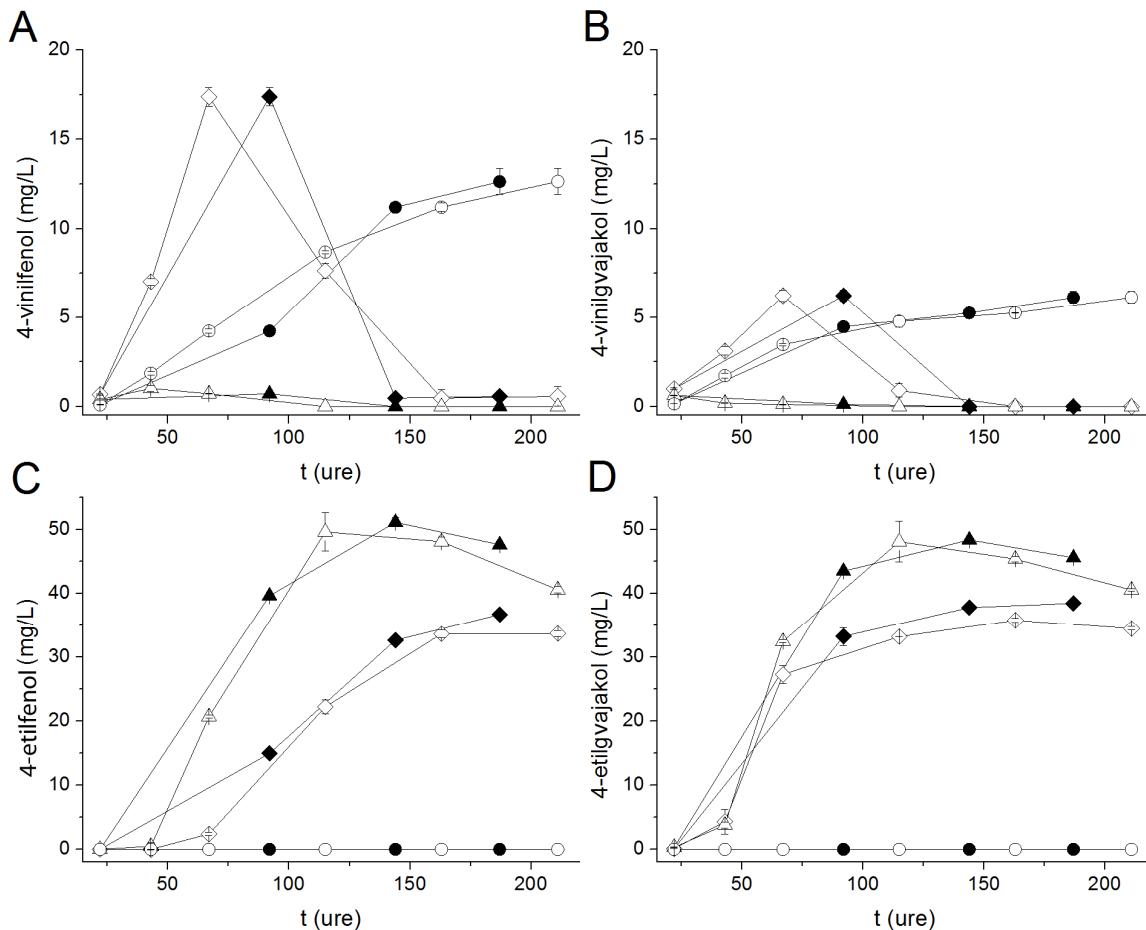
**Slika 7:** Rastna krivulja kvasovk (polni simboli) in absolutna sprememba v gostoti mošta ( $|\Delta\rho_{MS300}|$ ) (prazni simboli) po fermentacijah izvedenih v sintetičnem moštu MS300, ki je vseboval 100 mg/L hidroksicimetovih kislin (■, □), ali 100 mg/L vinilfenolov (▲, △): a) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae* (neprekinjena črta), b) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* 701 (prekinjena črta) in c) mešane fermentacije. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajerjicah.

Figure 7: Yeast growth (filled symbols) and absolute change in must density ( $|\Delta\rho_{MS300}|$ ) (open symbols) after fermentations performed in synthetic must MS300 containing 100 mg/L of hydroxycinnamic acids (■, □), or 100 mg/L of vinylphenols (▲, △): a) *S. cerevisiae* pure culture fermentations (solid line), b) *D. bruxellensis* 701 pure culture fermentations (dashed line), and c) mixed culture fermentations. Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.

#### 4.1.1.2 Producija hlapnih fenolov v membranskih bioreaktorjih in erlenmajericah

Sinteza hlapnih fenolov je ostala približno enaka tako v fermentacijah izvedenih v membranskih bioreaktorjih kot v fermentacijah izvedenih v erlenmajericah (slika 8). To je veljalo tako za mešane (oziroma za membransko ločene v primeru uporabe membranskega biorekatorja) kot čiste kulture obeh vrst kvasovk. V naslednjem odstavku so predstavljeni skupni rezultati produkcije hlapnih fenolov v membranskih bioreaktorjih in v erlenmajericah.

V čistih fermentacijah, ki so vsebovale 100 mg/L HCK, je kvasovka *S. cerevisiae* sintetizirala okoli 6,0 mg/L 4-VG in okoli 12,5 mg/L 4-VF (slika 8a in 8b). Nadalje je kvasovka *D. bruxellensis* v čistih kulturah popolnoma asimilirala HCK in jih pretvorila do približno 48,0 mg/L 4-EG in do približno 49,0 mg/L 4-EF (slika 8c in 8d). Potemtakem je bila pretvorba HCK v etilfenole skoraj 100 %. V teh fermentacijah ni prišlo do nastajanja vinilfenolov. V mešanih fermentacijah (oziroma v membransko ločenih fermentacijah v primeru uporabe membranskega biorekatorja) je kvasovka *S. cerevisiae* v prvih 70 urah (v primeru inkubacije v erlenmajericah) ali 90 urah (v primeru inkubacije v membranskih bioreaktorjih) akumulirala okoli 6,5 mg/L 4-VG in okoli 17,5 mg/L 4-VF (slika 8a in 8b). V primerjavi s čistimi fermentacijami je potemtakem prišlo do podobne končne sinteze 4-VG, produkcija 4-VF pa je narasla za 5,0 mg/L. Po 70 ali 90 urah inkubacije v mešanih fermentacijah (oziroma v membransko ločenih fermentacijah v primeru uporabe membranskega biorekatorja) je kvasovka *D. bruxellensis* popolnoma asimilirala vse vinilfenole (slika 8a in 8b). Za oba sistema inkubacije je proti koncu teh fermentacij nastalo okoli 35 mg/L 4-EG in približno enako 4-EF (slika 8c in 8d). Če to biosintezo etilfenolov primerjamo z njihovo biosintezo v čistih kulturah kvasovke *D. bruxellensis* ugotovimo, da je bila produkcija etilfenolov v mešanih/membransko ločenih fermentacijah (35 mg/L 4-EG in okoli 35 mg/L 4-EF) za 30 % nižja v primerjavi z njihovo produkcijo v čistih kulturah kvasovke *D. bruxellensis* (48,0 mg/L 4-EG in 49,0 mg/L 4-EF).



**Slika 8:** Kinetika proizvodnje hlapnih fenolov v membranskem bioreaktorju (polni simboli) in v 250 mL erlenmajericah (odprtji simboli). Fermentacije, ki smo jih izvedli v erlenmajericah z obema kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* smo poimenovali mešane fermentacije, tiste, ki pa smo jih izvedli v membranskih bioreaktorjih pa smo poimenovali membransko ločene fermentacije. Simboli: čista kultura kvasovke *S. cerevisiae* (●, ○), čista kultura kvasovke *D. bruxellensis* (▲, △) in mešane kulture (oziroma z membrano ločene kulture v primeru uporabe membranskega bioreaktorja) (◆, ◇). Proizvodnja (A) 4-vinilfenola, (B) 4-vinilguajakola, (C) 4-etilfenola in (D) 4-etilguajakola. Vse fermentacije so bile izvedene v umetnem moštu MS300 dopolnjenem s 100 mg/L HCK.

Figure 8: Comparing volatile phenol production of fermentations performed in double-compartment membrane systems (filled symbols) with those performed in regular Erlenmeyer flasks (open symbols). Fermentations, which were carried out in Erlenmeyer flasks with both yeasts *S. cerevisiae* and *D. bruxellensis* were called mixed fermentations, and the ones that were carried out in membrane bioreactors were called membrane-separated fermentations. Symbols: *S. cerevisiae* pure (●, ○), *D. bruxellensis* pure (▲, △) and mixed culture fermentations (or membrane-separated culture fermentations in the case of using a membrane bioreactor) (◆, ◇). Production of (A) 4-vinylphenol, (B) 4-vinylguaiacol, (C) 4-ethylphenol and (D) 4-ethylguaiacol. All fermentations were performed in synthetic must MS300 containing 100 mg/L of HCK.

#### 4.1.2 Transkriptomska analiza

Vzorce iz predela membranskega bioreaktorja, v katerega smo inokulirali kvasovko *S. cerevisiae*, smo uporabili za ekstrakcijo RNA in za transkriptomske analize. Vzorčili smo v

štirih časovnih točkah fermentacije in sicer v začetku fermentacije, v eksponentni fazi rasti ter v zgodnji in v pozni stacionarni fazi rasti.

Ko smo primerjali fermentacije v membransko ločenih kulturah kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* s fermentacijami čistih kultur kvasovke *S. cerevisiae*, smo identificirali 77 transkriptov kvasovke *S. cerevisiae*, katerim izražanje se je povečalo v membransko ločenih kulturah za vsaj dvakrat (vsebovali so izražanje z vsaj dvakratno mejno vrednostjo; glej prilogo D). Pri tem nismo odkrili nobenega transkripta kvasovke *S. cerevisiae*, katerega izražanje je bilo v membransko ločenih kulturah zmanjšano za vsaj dvakrat. Od 77 pozitivno izraženih transkriptov se je osmim izražanje povečalo na začetku fermentacije (po 22 urah), štiri desetim v eksponentni fazi (po 92 urah), dvajsetim v zgodnji (po 144 urah) in štiriinidesetim v pozni stacionarni fazi rasti (po 187 urah). Le 22,1 % (17 ORF-ov) transkriptov je kazalo povečano izražanje v vsaj dveh od štirih časovnih točk skozi celotno fermentacijo.

Po hierarhični razvrstitvi, se je 77 transkriptov s povečanim izražanjem prerazporedilo v 4 skupine, in sicer glede na njihov vzorec izražanja skozi 4 časovne točke fermentacije (preglednica 32). V sliki 9 so prikazani povprečni vzorci izražanja vseh transkriptov znotraj določene skupine. Grafe povprečnih vzorcev izražanja smo narisali v programske paketu Expander. Algoritem CLICK je v skupino 1 razvrstil tiste gene, katerih izražanje je bilo največje v začetku (po 22 urah) in v eksponentni fazi fermentacije (po 92 urah), po eksponentni fazi pa je izražanje strmo upadlo (Slika 9a in 9b). V skupino 2 so bili razvrščeni tisti transkripti, katerih izražanje je postopoma naraščalo do zgodnje stacionarne faze rasti (po 144 urah), nato pa je ostalo konstantno do konca pozne stacionarne faze (po 187 urah) (Slika 9c in 9d). V skupino 3 so bili razvrščeni tisti transkripti, katerih izražanje je v eksponentni fazi fermentacije upadlo na najnižjo raven, od tam naprej pa je naraščalo do konca fermentacije (Slika 9e in 9f). V zadnjo skupino 4 so bili razvrščeni tisti transkripti, ki so se najmočneje izražali v eksponentni in v zgodnji stacionarni fazi fermentacije (Slika 9g). V primeru membransko ločenih fermentacij so geni v skupini 4 kazali največje izražanje v začetku fermentacije, to izražanje pa je po 144 urah inkubacije stagniralo in dokončno upadlo (Slika 9h).

V skupino 1 se je razvrstilo 36 ORF-ov, in sicer pod naslednje funkcijске ontologije: nepoznani biološki proces, odziv na stres in presnovni proces lipidov (preglednica 32). V skupino 2 se je razvrstilo 13 ORF-ov, in sicer pod funkcijске ontologije: nepoznani biološki proces in celična delitev. V skupino 3 se je razvrstilo 18 ORF-ov, in sicer pod funkcijске ontologije: nepoznani biološki proces in mejoza. V zadnjo skupino 4 pa se je razvrstilo 10 ORF-ov pod funkcijске ontologije: biosinteza tiamina, nepoznani biološki proces in transmembranski transport. Analiza genske ontologije je pokazala, da za kar 70,1 % (54 ORF-ov) pozitivno izraženih transkriptov (77 transkriptov) ni poznanih bioloških funkcij in da so razvrščeni pod neznani biološki proces.

Dodatno smo za vseh 77 transkriptov naredili pregled ali se njihovo izražanje povečalo tudi med odzivom kvasovke *S. cerevisiae* na anaerobiozni stres (560 ORF-ov) (Lai in sod., 2006), na osmotski stres spodbujen s sladkorji (406 ORF-ov) (Erasmus in sod., 2003) in na fermentacijski stres (224 ORF-ov) (Marks in sod., 2008). Rezultati tega pregleda so predstavljeni v preglednici 32.

**Preglednica 32: Razporeditev pozitivno izraženih transkriptov kvasovke *S. cerevisiae* v 4 skupine.** Analiza genske ontologije je prikazana pod kategorijo. Črke v nadpisu označujejo tiste transkripte, katerih izražanje se je povečalo med odzivom kvasovke *S. cerevisiae* na <sup>A</sup> anaerobiozni stres (560 ORF-ov) (Lai in sod., 2006), na <sup>B</sup> osmotski stres spodbujen s sladkorji (406 ORF-ov) (Erasmus in sod., 2003) in na <sup>C</sup> fermentacijski stres (224 ORF-ov) (Marks in sod., 2008).

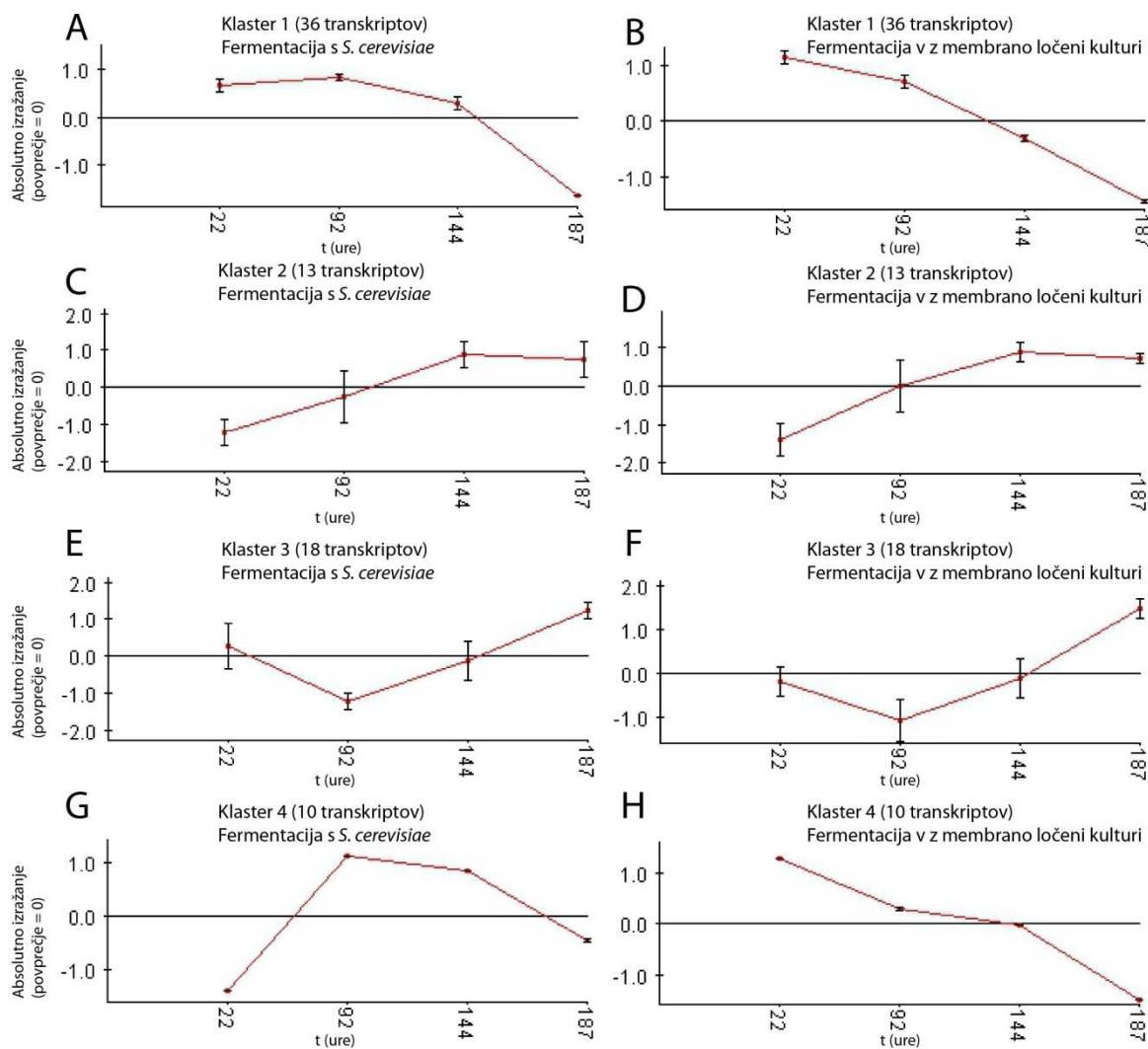
Table 32: Up-regulated transcripts of yeast *S. cerevisiae* clustered into 4 clusters. Functional enrichment analysis is depicted under category. Letters marked in the headings of transcript names present those transcripts which were also up-regulated during the *S. cerevisiae* response to <sup>A</sup> anaerobiosis induced stress (560 ORFs) (Lai et al., 2006), <sup>B</sup> sugar induced osmotic stress response (406 ORFs) (Erasmus et al., 2003) and <sup>C</sup> fermentation stress response (224 ORFs) (Marks et al., 2008).

Skupine	Kategorija	V kategoriji iz skupine
Skupina 1 (36 ORF-ov); Homogenost 0,877	<b>Nepoznani biološki proces</b> [GO:0008150] ( <i>p</i> -vrednost 0,00021; 28 ORF-ov)	<i>PAU1</i> <sup>A</sup> , <i>PAU2</i> <sup>A</sup> , <i>PAU3</i> <sup>A</sup> , <i>PAU5</i> <sup>A</sup> , <i>PAU7</i> <sup>A</sup> , <i>PAU11</i> <sup>A</sup> , <i>PAU12</i> <sup>A</sup> , <i>PAU14</i> <sup>A</sup> , <i>PAU15</i> <sup>A</sup> , <i>PAU17</i> <sup>A</sup> , <i>PAU21</i> <sup>C</sup> , <i>PAU22</i> , <i>PAU23</i> <sup>A</sup> , <i>PAU24</i> <sup>A</sup> , <i>YLR282C</i> , <i>YOR146W</i> , <i>YPR092W</i> , <i>YLR366W</i> , <i>YFL012W-A</i> , <i>YBR209W</i> , <i>YJR038C</i> , <i>YDR360W</i> , <i>YHL045W</i> , <i>YNR042W</i> , <i>YPR002C-A</i> , <i>YLR162W</i> , <i>YLR225C</i> <sup>B</sup> in <i>YOL014W</i>
	<b>Odziv na stres</b> [GO:0006950] ( <i>p</i> -vrednost 0,00093; 16 ORF-ov)	<i>PAU1</i> <sup>A</sup> , <i>PAU2</i> <sup>A</sup> , <i>PAU3</i> <sup>A</sup> , <i>PAU5</i> <sup>A</sup> , <i>PAU7</i> <sup>A</sup> , <i>PAU11</i> <sup>A</sup> , <i>PAU12</i> <sup>A</sup> , <i>PAU14</i> <sup>A</sup> , <i>PAU15</i> <sup>A</sup> , <i>PAU17</i> <sup>A</sup> , <i>PAU21</i> <sup>C</sup> , <i>PAU22</i> , <i>PAU23</i> <sup>A</sup> , <i>PAU24</i> <sup>A</sup> , <i>CTT1</i> <sup>B</sup> and <i>YLR225C</i> <sup>B</sup>
	<b>Presnovni proces lipidov</b> [GO:0006629] ( <i>p</i> -vrednost of 0,00174; 4 ORF-i)	<i>PLB2</i> <sup>A</sup> , <i>IZH1</i> , <i>IZH4</i> <sup>A</sup> in <i>YSR3</i> <sup>A</sup>
Skupina 2 (13 ORF-ov); Homogenost 0,869	<b>Nepoznani biološki proces</b> [GO:0008150] ( <i>p</i> -vrednost 0,00084; 9 ORF-ov)	<i>FYV1</i> , <i>SPG4B</i> , <i>YHL005C</i> , <i>YGL074C</i> , <i>YJL150W</i> <sup>C</sup> , <i>YLR031W</i> , <i>YNL120C</i> , <i>YMR245W</i> in <i>YDR374C</i>
	<b>Celična delitev</b> [GO:0051301] ( <i>p</i> -vrednost 0,00925; 3 ORF-i)	<i>SPR28</i> , <i>SHE1</i> in <i>KCC4</i>

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 32: Razporeditev pozitivno izraženih transkriptov kvasovke *S. cerevisiae* v 4 skupine. «

Skupine	Kategorija	V kategoriji iz skupine
Skupina 3 (18 ORF-ov); Homogenost 0,861	<b>Nepoznani biološki proces</b> [GO:0008150] ( <i>p</i> -vrednost 0,00037; 15 ORF-ov)	<i>CRP1, YAL034C-B, YML047W-A,</i> <i>YKL202W, YPL073C, YFL019C,</i> <i>YDL221W, YPR136C, YFL032W,</i> <i>YJL152W, YCL023C, YOL035C,</i> <i>YGL188C, YGR139W in YGL015C</i>
	<b>Mejoza</b> [GO:0007126] ( <i>p</i> -vrednost of 0,00451; 2 ORF-a)	<i>IME2</i> in <i>GMC2</i>
Skupina 4 (10 ORF-ov); Homogenost 0,854	<b>Biosinteza tiamina</b> [GO:0009228] ( <i>p</i> -vrednost 0,00317; 5 ORF-ov)	<i>THI5, THI11<sup>B</sup>, THI12, THI13</i> in <i>THI22</i>
	<b>Nepoznani biološki proces</b> [GO:0008150] ( <i>p</i> -vrednost 0,00637; 2 ORF-a)	<i>YLR458W</i> in <i>YMR252C<sup>A,C</sup></i>
	<b>Transmembranski transport</b> [GO:0055085] ( <i>p</i> -vrednost 0,00883; 2 ORF-a)	<i>UGA4</i> in <i>MUPI<sup>A</sup></i>



**Slika 9:** Vzorec izražanja transkriptov kvasovke *S. cerevisiae* znotraj določene skupine. Prikazani so povprečni vzorci izražanja za vse 4 skupine. Za določeno skupino sta prikazana dva povprečna vzorca izražanja, in sicer za pogoje čistih kultur s kvasovko *S. cerevisiae* (grafi A, C, E in G) in za pogoje membransko ločenih kultur s kvasovkama *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae* (grafi B, D, F in H). Za lažjo predstavitev so bila vsa absolutna izražanja za določen gen za vse 4 časovne točke fermentacije hkrati (vzorec izražanja za določen gen) normalizirana tako, da se je njihova skupna povprečna vrednost ujemala s številom 0 (varianca je 1).

Figure 9: Gene expression pattern of transcripts of yeast *S. cerevisiae* within a defined cluster. The average expression patterns for all four clusters are presented. For each cluster two average expression patterns are presented. One for pure cultures with yeast *S. cerevisiae* (graphs A, C, E in G) and one for the membrane-separated cultures of yeasts *D. bruxellensis* and *S. cerevisiae* (graphs B, D, F in H). For ease of presentation all the absolute expression values for a certain gene in all 4 time points of fermentation (expression pattern for a certain gene) were normalized so that their overall mean value was 0 (variance of 1).

#### 4.1.3 Analiza aromatskih snovi

Preglednica 33 prikazuje učinek membransko ločene kulture na kopiranje aromatskih komponent po 187 urah inkubacije oziroma po koncu fermentacije (v prilogah B1, B2 in B3 so predstavljena vsa nakopičenja aromatskih komponent po 22, 92 in 144 urah

fermentacije). V primerjavi s fermentacijami s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae* smo ugotovili, da imajo membransko ločene kulture s kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* statistično značilen vpliv na nastanek večine aromatskih snovi. Aromatske snovi, na katere membransko ločene kulture niso imele statistično značilnega vpliva, so bile: etilvalerat ( $p < 0,02$ ), etilheksanoat ( $p < 0,6$ ), oktanojska kislina ( $p < 0,4$ ), dodekanojska kislina ( $p < 0,2$ ), 2-feniletanol ( $p < 0,5$ ) in heksanol ( $p < 0,2$ ).

Sinteza acetatnih estrov in višjih alkoholov se je večinoma zmanjšala pod pogoji membransko ločenih fermentacij. In sicer smo statistično signifikantno zmanjšanje pod temi pogoji zabeležili za naslednje acetatne estre: izoamil-acetat ( $p < 0,001$ ), izobutil-acetat ( $p < 0,001$ ), 2-fenil-etil-acetat ( $p < 0,003$ ), propilacetat ( $p < 0,003$ ) in butilacetat ( $p < 0,007$ ). Nadalje smo signifikantno zmanjšanje izmerili za naslednje više alkohole: izoamil-alkohol ( $p < 0,002$ ), izobutanol ( $p < 0,004$ ) in 2-metil-1-butanol ( $p < 0,006$ ). V čistih fermentacijah s kvasovko *S. cerevisiae* je v primerjavi z membransko ločenimi fermentacijami nastalo največ izoamil-acetata (1195 µg/L) in izobutil-acetata (128 µg/L).

Za razliko od acetatnih estrov in višjih alkoholov se je sinteza etilnih estrov in maščobnih kislin povečala pod pogoji membransko ločenih fermentacij (preglednica 33). Statistično signifikantno povečanje smo opazili pri naslednjih etilnih estrih: etilcinamat ( $p < 0,001$ ), etil-fenil-acetat ( $p < 0,001$ ), dietilsukcinat ( $p < 0,002$ ), etil-izobutirat ( $p < 0,001$ ), etil-izovalerat ( $p < 0,001$ ), etil-2-metil-butirat ( $p < 0,001$ ), etilbutirat ( $p < 0,02$ ), etilpropionat ( $p < 0,03$ ), etiloktanoat ( $p < 0,002$ ), etildekanoat ( $p < 0,002$ ), etildodecanoat ( $p < 0,002$ ) in etilheptanoat ( $p < 0,04$ ). Od maščobnih kislin pa smo signifikantno povečanje opazili pri: izovalerni kislini ( $p < 0,001$ ), heksanojski kislini ( $p < 0,009$ ) in pri dekanojski kislini ( $p < 0,002$ ). Od etilnih estrov se je v membransko ločenih kulturah sintetiziralo največ etil-laktata (9590 µg/L), dietilsucinata (67 µg/L), etil-izobutirata (107 µg/L), etilbutirata (134 µg/L) in etiloktanoata (79,6 µg/L), od maščobnih kislin pa največ izovalerne (1,23 mg/L) in heksanojske kisline (1,83 mg/L).

**Preglednica 33: Povprečne vrednosti in standardni odkloni hlapnih estrov, maščobnih kislin (SCFA: kratko verižne in MCFA: srednje verižne maščobne kisline) in alkoholov, ki so se akumulirali v sintetičnem moštu po 187 urah čistih in membransko ločenih fermentacij s kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Predstavljena je analiza variance za membransko ločeno proti čisti kulturi inokulirani s kvasovko *S. cerevisiae*. Anova p-vrednosti so predstavljene kot: \* p-vrednost < 0,05, \*\* p-vrednost < 0,01, \*\*\* p-vrednost < 0,001; meritve označene z »nd« so bile pod mejo detekcije; ANOVA p-vrednosti označene z »ns« niso bile statistično značilne.**

Table 33: Mean values and standard deviations of volatile esters, fatty acids (SCFA: short-chain and MCFA: medium-chain fatty acid) and alcohols accumulated in synthetic must after 187 h of *S. cerevisiae* and *D. bruxellensis* membrane-separated and pure culture fermentations. Analysis of variance for membrane-separated versus *S. cerevisiae* pure culture fermentation is presented. Anova p-values are presented as: \* p-value < 0,05; \*\* p-value < 0,01; \*\*\* p-value < 0,001; measurements marked with »nd« were below detection; anova p-values marked with »ns« were statistically not significant.

Aromatske snovi	Čista kultura s kvasovko <i>S. cerevisiae</i>	Čista kultura s kvasovko <i>D. bruxellensis</i>	Fermentacija v membransko ločeni kulturi	ANOVA Membransko ločena kultura proti čisti kulturi <i>S. cerevisiae</i>
<b>Statistično značilno povečana ali nespremenjena produkcija v membransko ločeni proti čisti fermentaciji s kvasovko <i>S. cerevisiae</i></b>				
<b>Etil estri (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>				
Etilcinamat	2,6 ± 0,2	nd	5,5 ± 0,2	***
Etil-fenil-acetat	1,1 ± 0,1	nd	8,2 ± 0,5	***
Dietilsucinat	29 ± 3	nd	67 ± 6	**
Etil-laktat	8820 ± 190	126 ± 3	9590 ± 270	*
<b>Etil estri SCFA</b>				
Etil-izobutirat	25 ± 5	nd	107 ± 5	***
Etil-izovalerat	4,3 ± 0,5	nd	21,6 ± 0,9	***
Etil-2-metil-butirat	1,7 ± 0,1	nd	3,7 ± 0,2	***
Etilbutirat	113 ± 1	nd	134 ± 9	*
Etilpropionat	84 ± 7	nd	98 ± 1	*
Etilvalerat	2,1 ± 0,2	nd	2,3 ± 0,1	ns
<b>Etil estri MCFA</b>				
Etiloktanoat	45,3 ± 3,6	4,7 ± 3,1	79,6 ± 4,5	**
Etildekanoat	14,3 ± 1,8	1,38 ± 0,05	23,6 ± 0,2	**
Etildodekanoat	2,3 ± 0,1	nd	4,1 ± 0,4	**
Etilheptanoat	1,4 ± 0,1	nd	1,8 ± 0,2	*
Etilheksanoat	115 ± 7	nd	119 ± 9	ns
<b>Maščobne kisline (mg/L)</b>				
Izovalerna kislina	0,49 ± 0,04	0,43 ± 0,02	1,23 ± 0,02	***
Heksanojska kislina	1,5 ± 0,1	0,35 ± 0,02	1,83 ± 0,03	**
Dekanojska kislina	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,24 ± 0,01	**
Oktanojska kislina	0,56 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,54 ± 0,01	ns
Dodekanojska kislina	0,055 ± 0,008	nd	0,045 ± 0,007	ns

»se nadaljuje «

»nadaljevanje preglednice 33: Povprečne vrednosti in standardni odkloni hlapnih estrov, maščobnih kislin (SCFA: kratko verižne in MCFA: srednje verižne maščobne kisline) in alkoholov, ki so se akumulirali v sintetičnem moštu po 187 urah čistih in membransko ločenih fermentacij s kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*«

Aromatske snovi	Čista kultura s kvasovko <i>S. cerevisiae</i>	Čista kultura s kvasovko <i>D. bruxellensis</i>	Fermentacija v membransko ločeni kulturi	ANOVA Membransko ločena kultura proti čisti kulturi <i>S. cerevisiae</i>	
<b>Statistično značilno zmanjšana ali nespremenjena produkcija v membransko ločeni proti čisti fermentaciji s kvasovko <i>S. cerevisiae</i></b>					
<b>Acetatni estri (µg/L)</b>					
Izoamil-acetat	1195 ± 16	nd	793 ± 27	***	
Izobutil-acetat	128 ± 4	nd	59 ± 6	***	
2-fenil-etil-acetat	202 ± 9	nd	131 ± 15	**	
Propilacetat	23,7 ± 0,6	nd	20,8 ± 0,3	**	
Butilacetat	3,5 ± 0,1	nd	2,7 ± 0,2	**	
<b>Višji alkoholi (mg/L)</b>					
Izoamil-alkohol	348 ± 7	1,29 ± 0,04	287 ± 11	**	
Izobutanol	55 ± 3	0,15 ± 0,01	40,6 ± 1,6	**	
2-metil-1-butanol	10,85 ± 0,09	0,11 ± 0,01	10,1 ± 0,2	**	
2-feniletanol	43 ± 3	0,28 ± 0,08	41,4 ± 1,2	ns	
Heksanol	0,025 ± 0,004	0,022 ± 0,007	0,029 ± 0,001	ns	

## 4.2 VPLIV PREKURZORSKIH MOLEKUL, ETANOLA IN RAZLIČNIH SEVOV KVASOVKE *D. bruxellensis* NA PROIZVODNJO HLAPNIH FENOLOV V MEŠANIH FERMENTACIJAH S KVASOVKO *S. cerevisiae*

V tem tematskem sklopu so predstavljeni rezultati vpliva prekurzorskih molekul, etanola in različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* na produkcijo hlapnih fenolov v čistih in mešanih kulturah kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Predstavili smo tudi rezultate izražanja genov, ki kodirajo encime za sintezo hlapnih fenolov v obeh vrstah kvasovk. Vse fermentacije v tem tematskem sklopu so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah.

### 4.2.1 Vpliv prekurzorskih molekul v mešanih fermentacijah

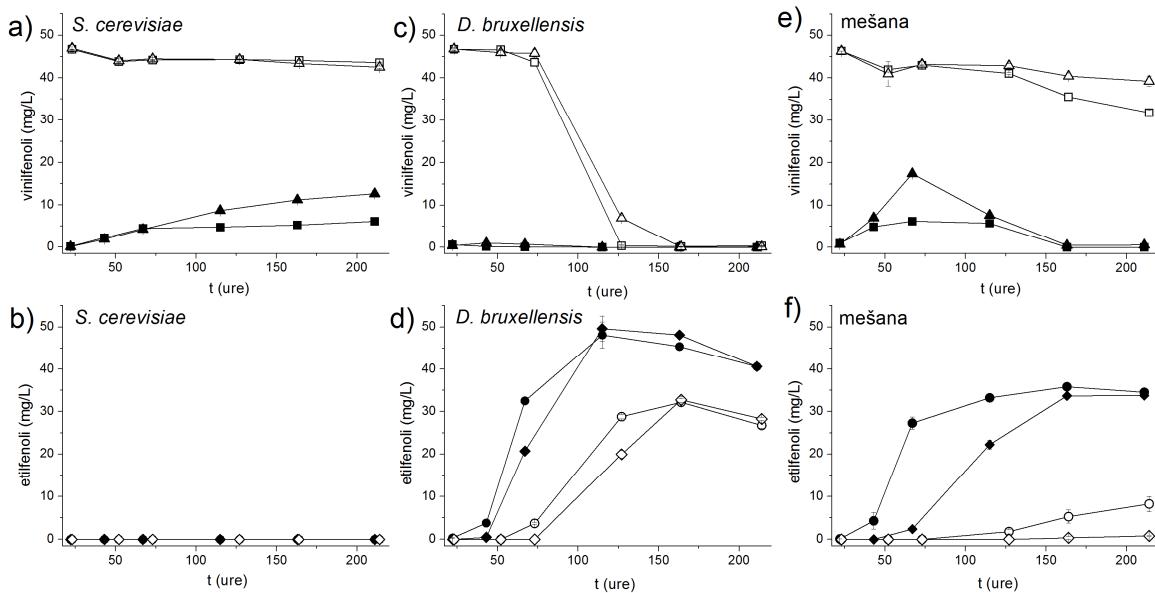
Ugotovili smo, da je v mešanih in čistih fermentacijah zamenjava 100 mg/L HCK z enako koncentracijo vinilfenolov vplivala na precejšnje zmanjšanje rasti (za  $1,0 \log_{10}\text{CFU/mL}$ ) kvasovke *S. cerevisiae* (sliki 7a in 7c). Po 214 urah je njena rast upadla na samo 6,5  $\log_{10}\text{CFU/mL}$ . Dodatno smo opazili, da je prisotnost vinilfenolov povzročila skrajšanje eksponentne faze rasti kvasovke *D. bruxellensis* 701. Vseeno pa je po 160 urah inkubacije rast kvasovke *D. bruxellensis* ponovno dosegla podobno raven celične gostote kot v gojišču, ki je vsebovalo HCK (sliki 7b in 7c). Na splošno so vinilfenoli negativno vplivali na absolutno spremembo v gostoti mošta, in sicer je v primeru kvasovke *S. cerevisiae* po 75 urah inkubacije absolutna sprememba znašala le 30 g/L v primeru kvasovke *D. bruxellensis* pa po 150 urah le 5,1 g/L. Torej, če primerjamo te vrednosti absolutnih

sprememb z vrednostmi v prisotnosti HCK, so se te zmanjšale za 18,76 g/L v primeru kvasovke *S. cerevisiae* in za 6,73 g/L v primeru kvasovke *D. bruxellensis* (sliki 7a in 7b).

V čistih kulturah kvasovke *S. cerevisiae* v 250 mL erlemajericah, pri katerih smo 100 mg/L HCK zamenjali s 100 mg/L vinilfenolov, je koncentracija eksterno dodanih vinilfenolov ostala skoraj nespremenjena do konca inkubacije in je le rahlo upadla (slika 10a). Kvasovka *D. bruxellensis* 701 je v čistih fermentacijah asimilirala vse eksterno dodane vinilfenole, pri čemer je proizvedla 32,2 mg/L 4-EG in 32,8 mg/L 4-EF (65 % pretvorba v etilfenole) (slika 10c in 10d). Zanimivo je, da v mešanih fermentacijah ni prišlo do popolne asimilacije eksterno dodanih vinilfenolov, pri čemer je po 214 urah fermentacije v fermentacijskem mediju še vedno ostalo 31,8 mg/L 4-VG in 39,2 mg/L 4-VF. Poleg tega se je biosintetiziralo le 8,2 mg/L 4-EG in 0,8 mg/L 4-EP (slika 10f).

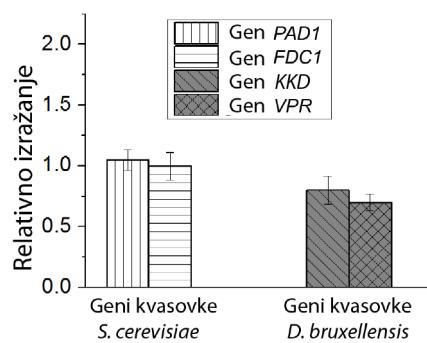
Izražanje genov za fermentacije, ki so potekale v prisotnosti 100 mg/L HCK, je predstavljeno v sliki 11. V primerjavi s čistimi kulturami je bilo izražanje genov *KKD* in *VPR* kvasovke *D. bruxellensis* znižano v mešanih fermentacijah, pri čemer je bila vrednost izražanja gena *KKD* 0,80-kratna in vrednost izražanja gena *VPR* 0,69-kratna (slika 11). Izražanje genov kvasovke *S. cerevisiae* je v mešanih fermentacijah ostalo konstantno, in sicer 1,04-kratno za gen *PAD1* in 0,97-kratno za gen *FDC1*.

V primerjavi s fermentacijami izvedenimi s HCK, pa so eksterno dodani vinilfenoli povečali izražanje gena *KKD* in *VPR* kvasovke *D. bruxellensis* tako v čistih (2,97-kratno za gen *KKD* in 2,27-kratno za gen *VPR*) kot v mešanih kulturah (1,79-kratno za gen *KKD* in 1,42-kratno za gen *VPR*) (slika 15a). V nasprotju s tem, pa so eksterno dodani vinilfenoli znižali izražanje genov *PAD1* in *FDC1* kvasovke *S. cerevisiae*, in sicer tako v mešanih (0,69-kratno za gen *PAD1* in 0,57-kratno za gen *FDC1*) kot v čistih kulturah (0,64-kratno za gen *PAD1* in 0,62-kratno za gen *FDC1*) (slika 15a).



**Slika 10:** Proizvodnja hlapnih fenolov v sintetičnem moštu MS300 dopolnjenem z bodisi 100 mg/L hidroksicimetovih kislin (polni simboli) ali 100 mg/L vinilfenolov (prazni simboli): a) in b) fermentacija s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae*, c) in d) fermentacija s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* 701 in e) in f) mešana fermentacija. Simboli: 4-vinilguajakol (■, ▲) in 4-vinilfenol (●, △) sta predstavljeni v grafih a), c) in e), in 4-etilguajakol (●, ○) in 4-etilfenol (◆, ◇) v grafih b), d) in f). Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah.

Figure 10: Volatile phenol production in synthetic must MS300 supplemented with either 100 mg/L of hydroxycinnamic acids (filled symbols) or 100 mg/L of vinylphenols (open symbols): a) and b) *S. cerevisiae* pure culture fermentation, c) and d) *D. bruxellensis* 701 pure culture fermentation, and e) and f) mixed culture fermentation. Symbols: production of 4-vinylguaiacol (■, ▲) and 4-vinylphenol (●, △) is presented in graphs a), c) and e) and production of 4-ethylguaiacol (●, ○) and 4-ethylphenol (◆, ◇) in graphs b), d) and f). Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.



**Slika 11:** Relativna raven izraženosti genov *PAD1*, *FDC1*, *KKD* in *VPR* kvasovk *S. cerevisiae* (beli stolpcji) in *D. bruxellensis* (sivi stolpcji) po 50 urah fermentacije v umetnem moštu dopolnjenem s 100 mg/L HCK. Izraženost je bila izračunana tako, da smo kot kontrole uporabili čiste kulture kot testne vzorce pa smo uporabili mešane fermentacije (če je relativna raven izraženosti 1, pomeni konstantno izražanje gena, če pa je 2 pa pomeni povečanje izražanja gena v mešani fermentaciji).

Figure 11: Relative expression levels of genes *PAD1*, *FDC1*, *KKD* and *VPR* in yeasts *S. cerevisiae* (white bars) and *D. bruxellensis* (gray bars) after 50 h of fermentation in medium supplemented with 100 mg/L of HCK. Fold change was calculated using pure cultures as controls and mixed cultures as test samples (relative expression level 1, means constant expression and level 2 means up-regulation in the mixed culture).

#### 4.2.2 Vpliv etanola v mešanih fermentacijah

V sintetičnem moštu MS300, ki je vseboval 20 mg/L HCK, so stopnjujoče se koncentracije etanola iz 2,5 do 10 %, postopno zmanjševale rast in absolutno spremembo gostote mošta tako pri kvasovki *S. cerevisiae* kot tudi pri kvasovki *D. bruxellensis* 701 (slika 12). Pri 2,5 % koncentraciji je bila celična gostota kvasovke *S. cerevisiae* za  $0,8 \log_{10}\text{CFU/mL}$  nižja v primerjavi s celično gostoto pridobljeno v kontrolnem moštu MS300 (20 mg/L HCK, 0 % etanola). Dodatno se je njena celična gostota tako v mešanih kot čistih kulturah pri 5 % koncentraciji etanola zmanjšala za  $1,3 \log_{10}\text{CFU/mL}$  in pri 10 % koncentraciji za  $1,7 \log_{10}\text{CFU/mL}$ . Pri 10 % koncentraciji alkohola smo opazili 22 urno lag fazo kvasovke *S. cerevisiae* (slika 12).

V mešanih fermentacijah, ki so vsebovale 2,5 ali 5 % etanola, smo proti koncu inkubacije opazili ustaljeno upadanje rasti kvasovke *D. bruxellensis* 701, in sicer do končne koncentracije  $6,7 \log_{10}\text{CFU/mL}$  (slika 12). Za razliko od mešanih fermentacij se je njena rast v čistih kulturah in v prisotnosti 2,5 ali 5 % etanola postopoma povečevala do konca inkubacije (slika 12). Na splošno je v čistih kulturah 5 % etanol (v primerjavi s kontrolnim moštom) zmanjšal celično gostoto kvasovke *D. bruxellensis* za  $0,8 \log_{10}\text{CFU/mL}$ . Pri 10 % etanolu smo opazili 160 urno lag fazo (slika 12).

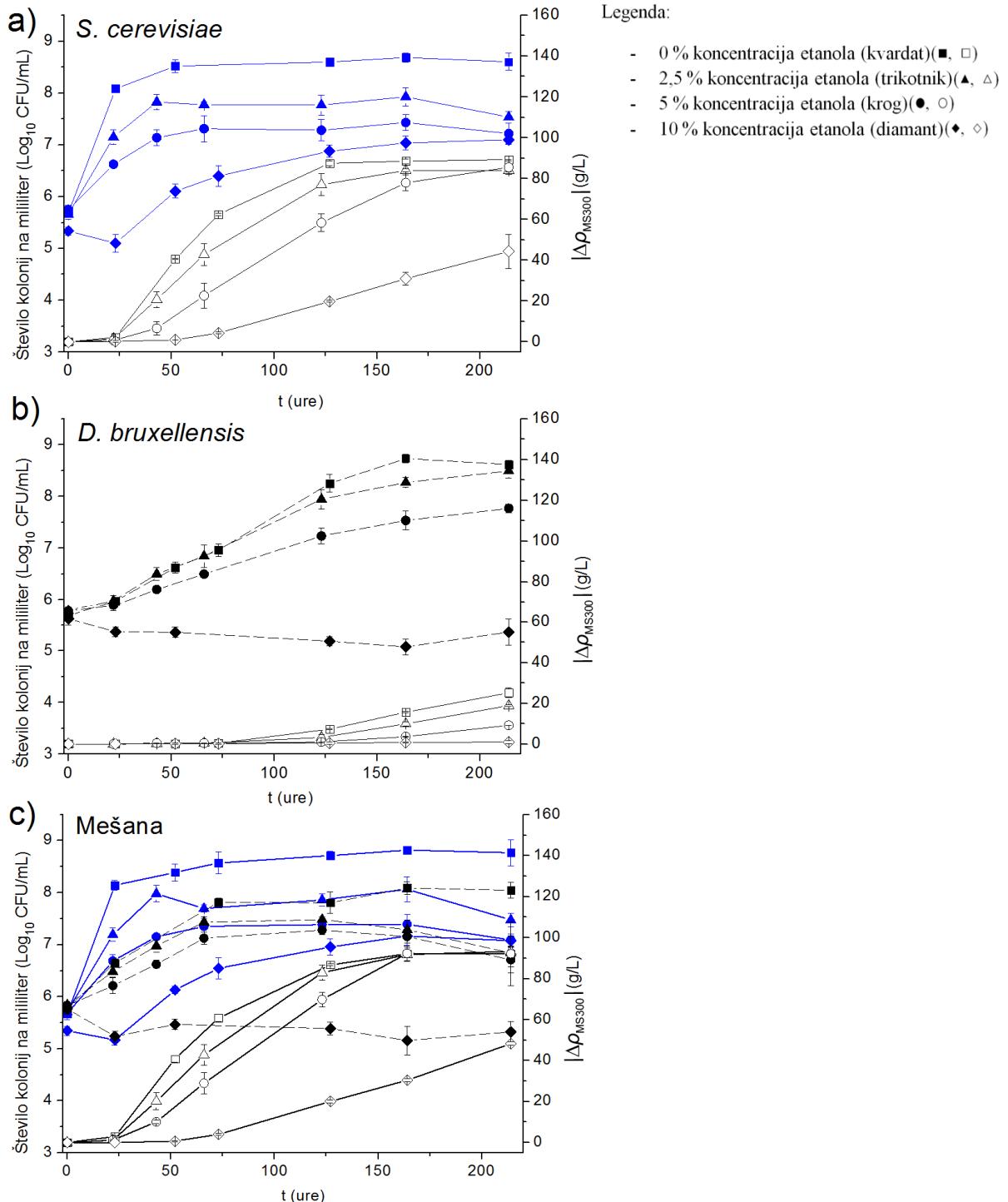
V kontrolnem moštu inokuliranem s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae* smo opazili 13,8 % pretvorbo ferulne kisline v 4-VG (1,4 mg/L) in 48,1 % pretvorbo *p*-kumarne kisline v 4-VF (4,8 mg/L) (slika 13 in 14). V prisotnosti 2,5 % etanola je prišlo do povečanja proizvodnje 4-VG (2,5 mg/L) in 4-VF (6,0 mg/L), in sicer v obeh primerih za 12,0 %. Pri 5 % koncentraciji etanola je bila pretvorba v 4-VF rahlo zakasnjena, proizvodnja 4-VG pa je bila za 5,3 % višja v primerjavi s kontrolnim moštom. 10 % koncentracija etanola je močno zavrla produkcijo 4-VF, pri čemer se ga je po 220 urah fermentacije sintetiziralo le 1,9 mg/L. Močno zavrtje pri tej koncentraciji etanola smo opazili tudi v primeru 4-VG, pri čemer se ga je po 125 urah sintetiziralo le 0,65 mg/L.

V fermentacijah s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis*, ki so vsebovale 2,5 ali 5 % etanol, ni prišlo do nakopičenja vinilfenolov. Za razliko od tega je v čistih kulturah 10 % etanol povzročil rahlo akumulacijo 4-VF do koncentracije 1,0 mg/L (slika 14). Vseeno pa pri tej koncentraciji etanola ni prišlo do signifikantnega nakopičenja 4-VG (slika 13). Zanimivo je, da je 2,5 % koncentracija etanol glede na 0 % koncentracijo etanola vplivala na pospešitev proizvodnje etilfenolov, in sicer v primeru 4-EG za 36 ur in v primeru 4-EF za 19 h (slika 13 in 14). V nasprotju z 2,5 % koncentracijo je 5 % etanol vplival na zakasnitev proizvodnje etilfenolov, in sicer za kar 30 ur v primeru 4-EG in za 21 ur v primeru 4-EF. 10 % etanol je močno zmanjšal biosintezo etilfenolov, pri čemer je nastalo samo 0,3 mg/L 4-EG, produkcija 4-EF pa je bila popolnoma zavrta.

V mešanih fermentacijah nismo opazili, da bi 2,5 % etanol kakor koli vplival na proizvodnjo vinilfenolov (slika 13 in 14). Pri 5 % etanolu je bilo kopičenje 4-VF zakasnjeno za 20 ur. Koncentracija 4-VF je po 125 urah inkubacije dosegla 2,9 mg/L, nato pa je začela upadati zaradi privzema s strani kvasovke *D. bruxellensis* 701. Podobno kot pri čistih fermentacijah s kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* 701, je 10 % alkohol vplival na počasno povečevanje v nakopičenju vinilfenolov, pri čemer se je na koncu

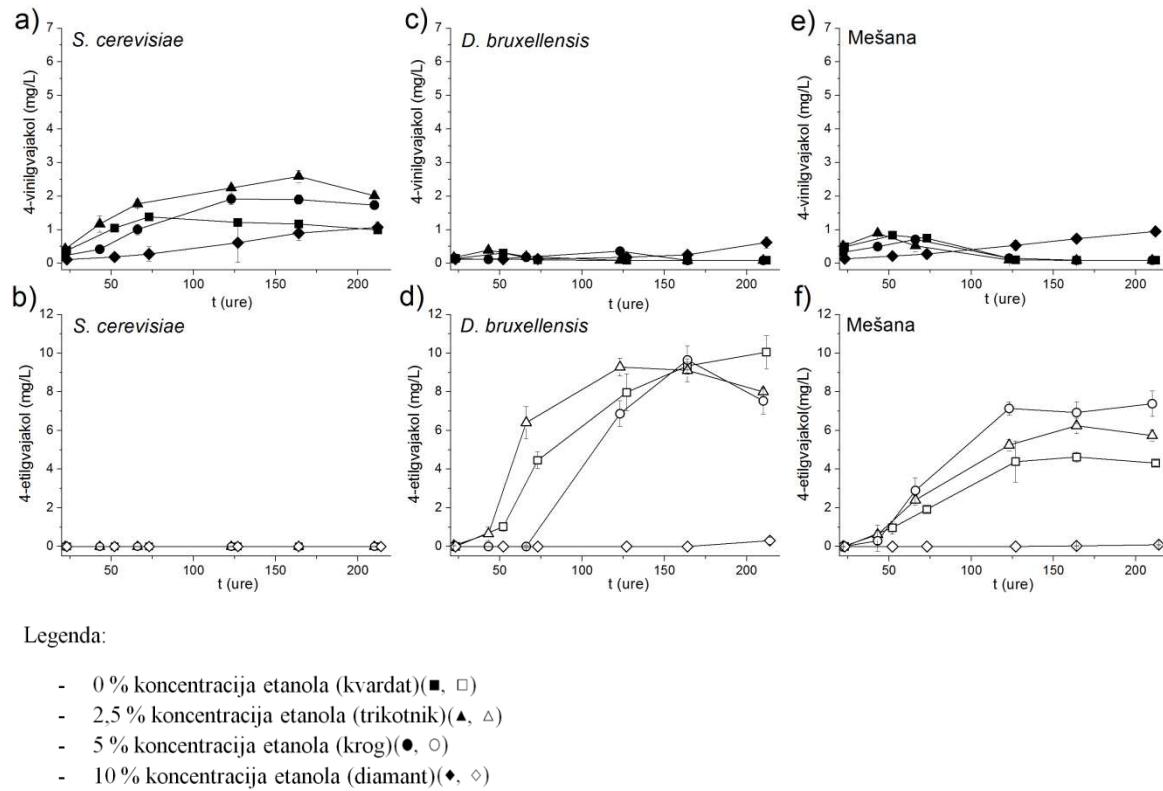
inkubacije nakopičilo 0,7 mg/L 4-VG in 2,1 mg/L 4-VF. V primerjavi s kontrolnim moštom so nizke koncentracije etanola spodbudile produkcijo etilfenolov. Dodatek 2,5 % alkohola je povečal proizvodnjo 4-EG za 16,2 % in 4-EF za 7,5% (slika 13 in 14). Nadalje je vnos 5 % etanola vplival na povečanje proizvodnje 4-EG za dodatnih 11,4 % (v celoti za 27,6 %) in 4-EF za dodatnih 9,7 % (v celoti za 17,2 %). V mešanih fermentacijah, ki so vsebovale 10 % koncentracijo etanola, nismo opazili nobenega nastanka etilfenolov do konca inkubacije.

Ker je dodatek 2,5 % etanola povečal proizvodnjo hlapnih fenolov v čistih in mešanih kulturah, smo se odločili, da bomo to koncentracijo etanola uporabili za preučevanje izražanja genov kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* 701. V primerjavi s kontrolnim moštom je 2,5 % etanol spodbudil izražanje gena *KKD* kvasovke *D. bruxellensis*. To se je zgodilo tako v mešanih kulturah (2,01-krat) kot v čistih kulturah te kvasovke (2,71-krat) (slika 15b). Nadalje smo ugotovili, da 2,5 % etanol ni statistično značilno vplival na izražanje gena *VPR* kvasovke *D. bruxellensis* in na izražanje gena *PAD1* kvasovke *S. cerevisiae*. Za konec smo opazili, da je bilo izražanje gena *FDC1* kvasovke *S. cerevisiae* rahlo zmanjšano v prisotnosti 2,5 % etanola. To je veljalo tako za čiste kulture te kvasovke (0,79-kratno) kot za mešane kulture (0,83-kratno).



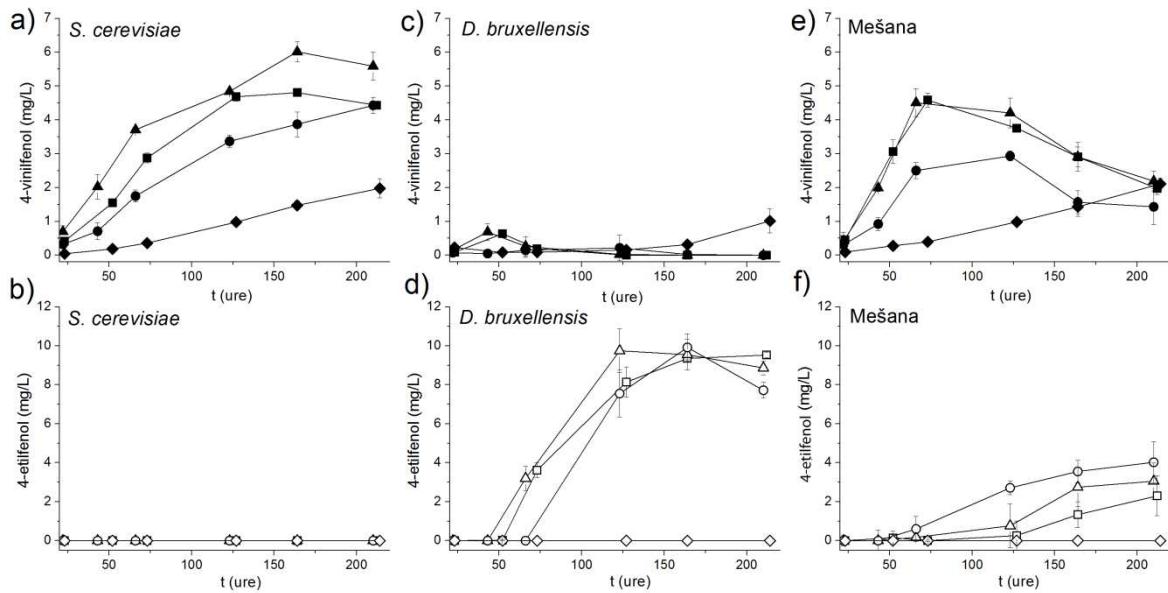
**Slika 12: Vpliv etanola na rastno krivuljo kvasovk (polni simboli) in na absolutno spremembo v gostoti mošta ( $|\Delta\rho_{MS300}|$ ) (prazni simboli): a) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae* (modri simboli), b) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* 701 (prekinjena črta s črnimi simboli) in c) mešane fermentacije. Sintetični mošt MS300 je vseboval 20 mg/L hidroksicimetovih kislin. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajerjach.**

Figure 12: Effect of ethanol on yeast growth (filled symbols) and on the absolute change in must density ( $|\Delta\rho_{MS300}|$ ) (open symbols): a) *S. cerevisiae* pure culture fermentations (blue symbols), b) *D. bruxellensis* 701 pure culture fermentations (black symbols with dashed line), and c) mixed culture fermentations. Synthetic must MS300 was supplemented with 20 mg/L of hydroxycinnamic acids. Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.



**Slika 13: Vpliv etanola na proizvodnjo 4-vinilguajakola (polni simboli) in 4-etilguajakola (prazni simboli) v sintetičnem moštu MS300 dopolnjem z 20 mg/L hidroksicimetovih kislin: a) in b) fermentacija s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae*, c) in d) fermentacija s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* 701 in e) in f) mešana fermentacija. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah.**

Figure 13: Effect of ethanol on the production of 4-vinylguaiacol (filled symbols) and 4-ethylguaiacol (open symbols) in synthetic must MS300 supplemented with 20 mg/L of hydroxycinnamic acids: a) and b) *S. cerevisiae* pure culture fermentations, c) and d) *D. bruxellensis* 701 pure culture fermentations, and e) and f) mixed culture fermentations. Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.

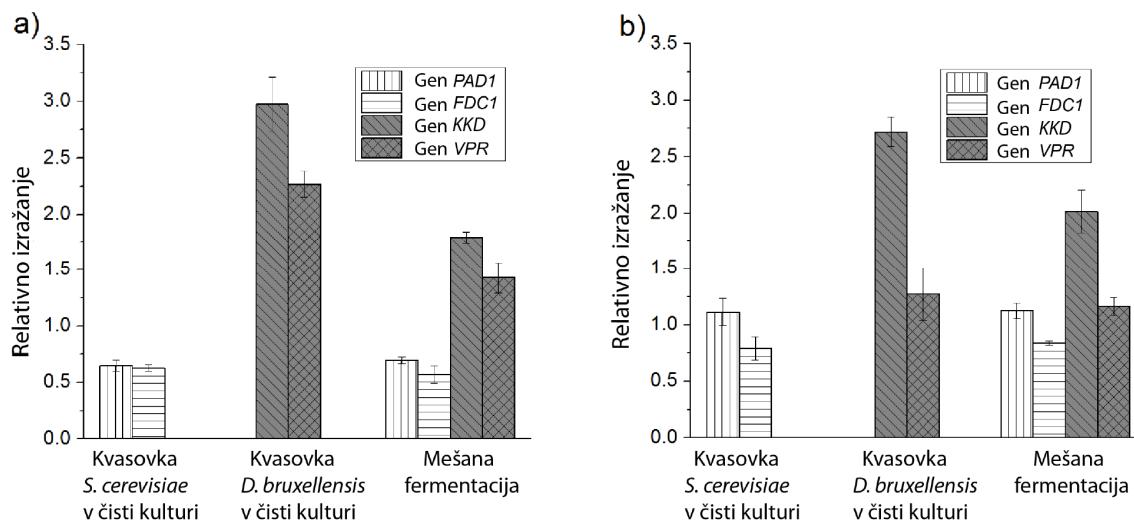


Legenda:

- 0 % koncentracija etanola (kvadrat)(■, □)
- 2,5 % koncentracija etanola (trikotnik)(▲, △)
- 5 % koncentracija etanola (krog)(●, ○)
- 10 % koncentracija etanola (diamant)(◆, ◇)

**Slika 14: Vpliv etanola na proizvodnjo 4-vinilfenola (polni simboli) in 4-etilfenola (prazni simboli) v sintetičnem moštu MS300 dopolnjenem z 20 mg/L hidroksicimetovih kislin: a) in b) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae*, c) in d) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* 701 in e) in f) mešane fermentacije. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah.**

Figure 14: Effect of ethanol on the production of 4-vinylphenol (filled symbols) and 4-ethylphenol (open symbols) in synthetic must MS300 supplemented with 20 mg/L of hydroxycinnamic acids: a) and b) *S. cerevisiae* pure culture fermentations, c) and d) *D. bruxellensis* 701 pure culture fermentations, and e) and f) mixed culture fermentations. Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.



**Slika 15: Relativna raven izraženosti genov *PAD1*, *FDC1*, *KKD* in *VPR* kvasovk *S. cerevisiae* (beli stolpci) in *D. bruxellensis* (sivi stolpci) po 50 urah fermentacije: a) zamenjava 100 mg/L HCK s 100 mg/L vinilfenolov v mešanih in čistih kulturah. Izraženost je bila izračunana tako, da smo kot kontrole uporabili fermentacije dopolnjene s HCK, kot testne vzorce pa smo uporabili fermentacije dopolnjene z vinilfenoli; b) Dodajanje etanola v umetni mošt MS300, ki je vseboval 20 mg/L HCK. Kontrolni vzorci niso vsebovali etanola, testni vzorci pa so bili dopolnjeni z 2,5% etanola.**

Figure 15: Relative expression levels of genes *PAD1*, *FDC1*, *KKD* and *VPR* in *S. cerevisiae* (white bars) and *D. bruxellensis* (gray bars) after 50 h of fermentation: a) the substitution of 100 mg/L of HCK with 100 mg/L of vinylphenols in mixed and pure cultures. Fold change was calculated using fermentations supplemented with HCK as controls and fermentations supplemented with vinylphenols as test samples; b) the addition of ethanol to media MS300 containing 20 mg/L of HCK. The controls were without ethanol and test samples were supplemented with 2,5 % ethanol.

#### 4.2.3 Vpliv uporabe različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* v mešanih fermentacijah

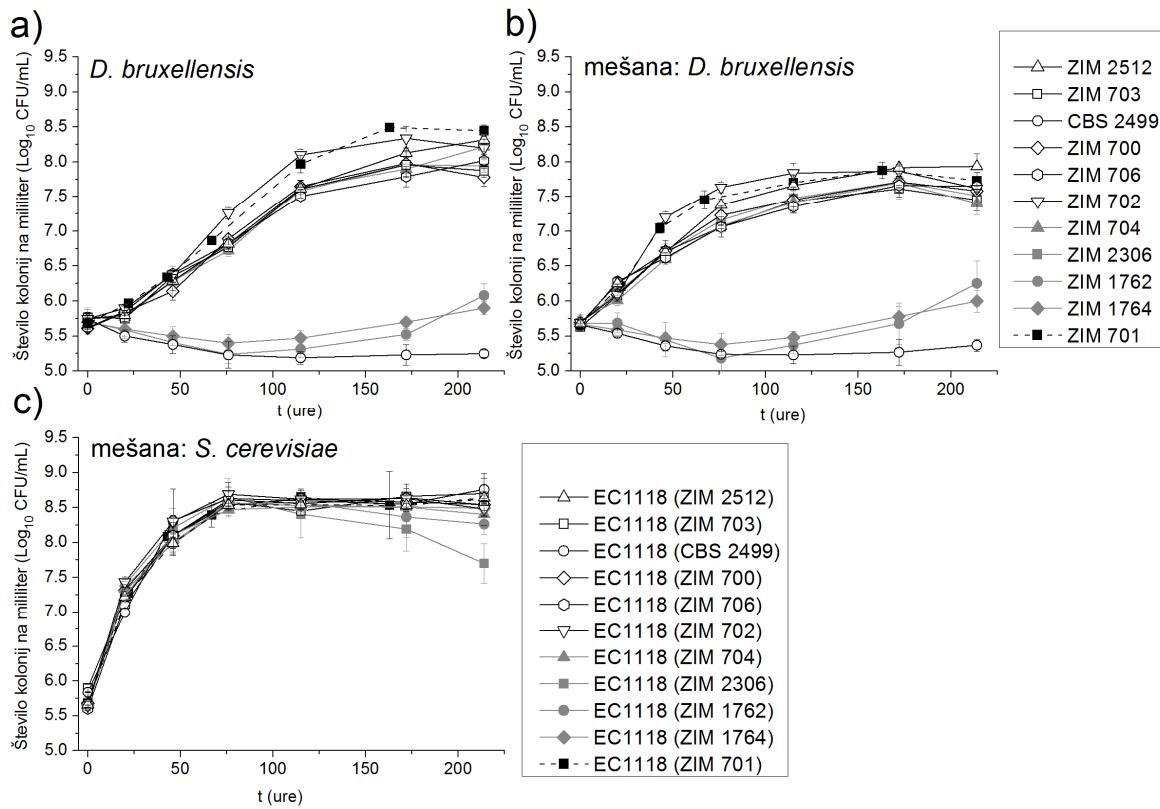
Iz rezultatov fermentacij enajstih sevov kvasovke *D. bruxellensis* (ZIM 2512, ZIM 703, ZIM 700, ZIM 706, ZIM 704, ZIM701, ZIM 702, ZIM 1764, ZIM 1762, CBS 2499 in ZIM 2306) v erlenmajericah smo ugotovili, da je večina sevov te kvasovke (ZIM 2512, ZIM 703, ZIM 700, ZIM 706, ZIM 704 in ZIM 2306) imela zelo podobno krivuljo rasti. Torej kar 6 sevov od 11. Teh 6 sevov je v umetnem moštu z 100 mg/L HCK v čisti kulturi dosegla okoli  $8,0 \log_{10}\text{CFU/mL}$  v mešani pa okoli  $7,5 \log_{10}\text{CFU/mL}$  (slika 16a in 16b). Eksponentna faza rasti je bila za vse te seve za  $0,5 \log_{10}\text{CFU/mL}$  večja v mešanih fermentacijah v primerjavi s čistimi kulturami. In sicer je rast teh sevov po 50 urah inkubacije v mešani kulturi dosegla okoli  $6,7 \log_{10}\text{CFU/mL}$  v čisti kulturi pa okoli  $6,2 \log_{10}\text{CFU/mL}$ . V čistih kulturah je za vseh 6 sevov (ZIM 2512, ZIM 703, ZIM 700, ZIM 706, ZIM 704 in ZIM 2306) absolutna sprememba v gostoti mošta znašala okoli 22 g/L (slika 17a).

V primerjavi z vsemi ostalimi sevi sta kontrolni sev ZIM 701 in sev ZIM 702 v eksponentni fazi rasti rasla najhitreje pri čemer sta že po 175 urah dosegla okoli  $8,3 \log_{10}\text{CFU/mL}$  v čisti kulturi in okoli  $7,8 \log_{10}\text{CFU/mL}$  v mešani kulturi (slika 16a in 16b). Eksponentna faza rasti je bila tudi v primeru teh dveh sevov za  $0,4 \log_{10}\text{CFU/mL}$  večja v mešanih fermentacijah v primerjavi s čistimi kulturami. In sicer je rast teh dveh sevov po

75 urah inkubacije v mešani kulturi dosegla okoli  $7,7 \log_{10}$ CFU/mL, v čisti kulturi pa okoli  $7,3 \log_{10}$ CFU/mL. Kljub splošni hitrejši rasti teh dveh sevov (tako v mešanih kot v čistih kulturah) v primerjavi z vsemi ostalimi obravnavanimi sevi, pa njune celokupne absolutne spremembe v gostoti mošta v čistih kulturah niso presegle vrednosti 22 g/L (slika 17a).

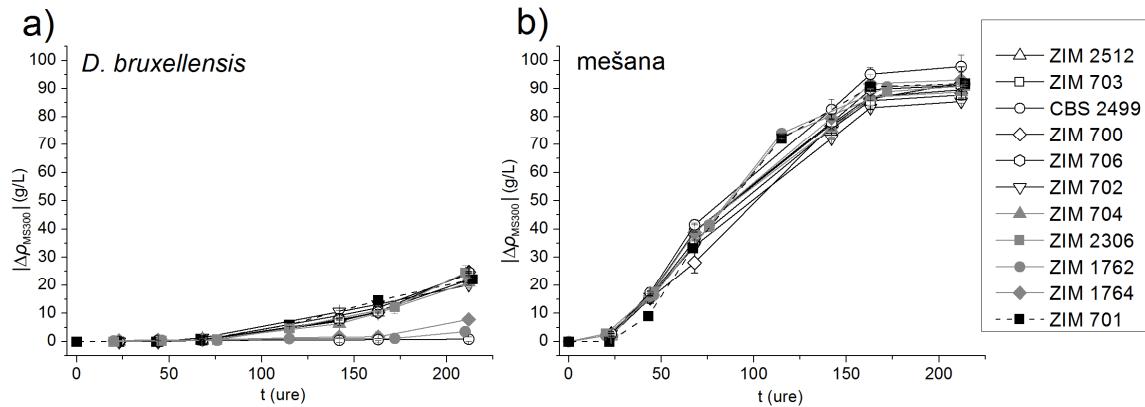
Nadalje so od vseh 11 sevov, sevi ZIM 1764, ZIM 1762 in CBS 2499 kazali najnižjo stopnjo rasti biomase (slika 16a in 16b). Rastni krivulji sevov ZIM 1764 in ZIM 1762 sta bili podobni, pri čemer sta v čisti in mešani kulturi dosegli okoli  $6,0 \log_{10}$ CFU/mL. Pri obeh sevih je bila prisotna 75 ur trajajoča lag faza prilagajanja rasti. Za sev ZIM 1764 je absolutna sprememba v gostoti mošta v čistih fermentacijah znašala 7,8 g/L, za sev ZIM 1762 pa le 3,5 g/L (slika 17a). Rastna krivulja seva CBS 2499 se je začela s kar 150 ur trajajočo lag fazo in šele po 170 urah rasti smo opazili rahlo povečanje do okoli  $5,4 \log_{10}$ CFU/mL v čisti kulturi in okoli  $5,1 \log_{10}$ CFU/mL v mešani kulturi (slika 16a in 16b). Od začetka do konca fermentacije s čisto kulturo seva CBS 2499 je končna absolutna sprememba v gostoti mošta znašala le 0,4 g/L (slika 17a).

Rastna krivulja seva EC-1118 kvasovke *S. cerevisiae* je bila v mešanih fermentacijah podobna za vseh 11 sevov kvasovke *D. bruxellensis* (slika 16c). V vseh primerih je sev EC-1118 dosegel okoli  $8,5 \log_{10}$ CFU/mL. Tudi absolutna sprememba v gostoti mošta je v vseh primerih znašala okoli 90 g/L (slika 17b). Zanimivo je, da smo proti koncu mešanih fermentacij s sevom ZIM 2306 kvasovke *D. bruxellensis* opazili zmanjšanje v rasti seva EC-1118 (slika 16c) do  $7,7 \log_{10}$ CFU/mL.



**Slika 16:** Rast biomase med fermentacijo z 11 različnimi sevi kvasovke *D. bruxellensis*. Vse fermentacije so bile izvedene v čisti ali mešani kulturi s kvasovko *S. cerevisiae* EC1118: a) rast kvasovke *D. bruxellensis* v čisti b) in mešani fermentaciji in c) rast kvasovke *S. cerevisiae* v mešani fermentaciji. Sevi, ki so označeni s sivimi simboli, so v mešani ali v čisti kulturi sintetizirali največje količine vinilfenolov. Sevi, ki so označeni s praznimi simboli, so v mešani ali v čisti kulturi sintetizirali manjše količine vinilfenolov. Kontrolni sev ZIM 701 je označen s črnim simbolom in s prekinjeno črto. Sintetični mošt MS300 je vseboval 100 mg/L hidroksicimetovih kislin. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah.

Figure 16: Yeast growth of 11 different *D. bruxellensis* strains in pure or in mixed culture fermentations with *S. cerevisiae* EC1118: a) The growth of the yeast *D. bruxellensis* in pure b) and in mixed fermentations, and c) the growth of yeast *S. cerevisiae* in mixed fermentations. Strains marked with gray symbols synthesized the highest quantities of vinylphenols in mixed or in pure culture fermentations. Strains marked with empty symbols synthesized lower quantities of vinylphenols in mixed or in pure culture fermentations. Control strain ZIM 701 is marked by a black symbol and a dashed line. Synthetic must MS300 contained 100 mg/L of hydroxycinnamic acids. Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.



**Slika 17: Absolutna sprememba v gostoti mošta ( $|\Delta\rho_{MS300}|$ ) po fermentacijah izvedenih z 11 različnimi sevi kvasovke *D. bruxellensis*. Vse fermentacije so bile izvedene v čisti ali mešani kulturi s kvasovko *S. cerevisiae* EC1118: a) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* in b) mešane fermentacije. Sevi, ki so označeni s sivimi simboli, so v mešani ali v čisti kulturi sintetizirali največje količine vinilfenolov. Sevi, ki so označeni s praznimi simboli, so v mešani ali v čisti kulturi sintetizirali manjše količine vinilfenolov. Kontrolni sev ZIM 701 je označen s črnim simbolom in s prekinjeno črto. Sintetični mošt MS300 je vseboval 100 mg/L hidroksicimetovih kislin. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah.**

Figure 17: Absolute change in must density ( $|\Delta\rho_{MS300}|$ ) after fermentations performed with 11 different *D. bruxellensis* strains in pure or in mixed cultures with *S. cerevisiae* EC1118: a) pure culture fermentations with yeast *D. bruxellensis* and b) mixed culture fermentations. Strains marked with gray symbols synthesized the highest quantities of vinylphenols in mixed or in pure culture fermentations. Strains marked with empty symbols synthesized the lowest quantities of vinylphenols in mixed or in pure culture fermentations. Control strain ZIM 701 is marked by a black symbol and a dashed line. Synthetic must MS300 contained 100 mg/L of hydroxycinnamic acids. Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.

Sevi ZIM 1762, ZIM 1764, ZIM 2306 in ZIM 704 so v primerjavi z ostalimi obravnavanimi sevi do konca fermentacije v splošnem (v mešanih ali čistih kulturah) proizvedli največjo količino vinilfenolov iz HCK (v slikah 18a, 18c, 19a in 19c so ti sevi označeni s sivo barvo). In sicer sta seva ZIM 1762 in ZIM 1764 sintetizirala največjo količino vinilfenolov v čistih kulturah, medtem ko sta seva ZIM 2306 in ZIM 704 sintetizirala največjo količino vinilfenolov v mešanih kulturah s kvasovko *S. cerevisiae*.

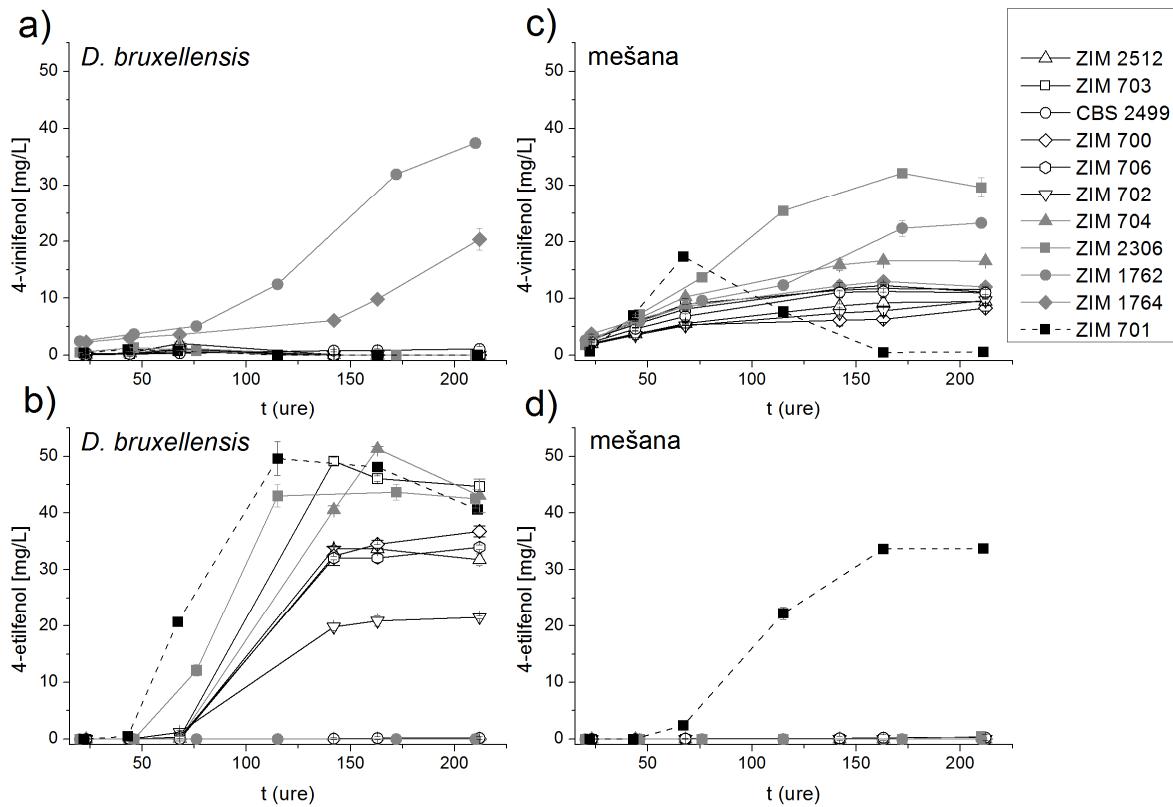
Sev ZIM 2306 je v čisti kulturi sintetiziral minimalne količine vinilfenolov, njegova pretvorba HCK v etilfenole pa je bila 81,1 % za 4-EG (40,6 mg/L) in 87,3 % za 4-EF (43,7 mg/L), (slika 18b in 19b). Zanimivo je, da se je v mešanih fermentacijah proizvodnja močno preusmerila v korist vinilfenolov, pri čemer je nastalo 13,4 mg/L 4-VG (26,8 % ferulne kisline) in kar 32,1 mg/L 4-VF (64,3 % *p*-kumarne kisline), (slika 18c in 19c). V mešanih kulturah je sev ZIM 2306 v primerjavi z vsemi obravnavanimi sevi (ostalih 10 sevov) sintetiziral največjo količino vinilfenolov. Proizvodnja etilfenolov pa se je v mešanih fermentacijah zmanjšala za 54,0 % v primeru 4-EG in za kar 86,3 % v primeru 4-EF (slika 18d in 19d). Podoben pojav smo opazili pri sevih ZIM 704, ZIM 2512, ZIM 703, CBS 2499, ZIM 700, ZIM 706 in ZIM 702. Sev ZIM 704 v čistih kulturah ni sintetiziral vinilfenolov, njegova pretvorba HCK v etilfenole pa je bila popolna v primeru 4-EF (50,8 mg/L) in 88,8 % v primeru 4-EG (44,4 mg/L) (slika 18b in 19b). V mešanih fermentacijah pa je ta sev sintetiziral 9,2 mg/L 4-VG (18,4 % ferulne kisline) in 16,6 mg/L 4-VF (33,2 %

*p*-kumarne kisline) ter le 2,0 mg/L 4-EG (4,0 % ferulne kisline) in nič 4-EF (slika 18c, 18d, 19c in 19d). Proizvodnja etilfenolov se je potemtakem v mešanih fermentacijah zmanjšala za 84,8 % v primeru 4-EG in za kar 100,0 % v primeru 4-EF (slika 18d in 19d). Ostali sevi ZIM 2512, ZIM 703, ZIM 700, ZIM 706 in ZIM 702 so pokazali zelo podobno produkcijo vinilfenolov tako v mešanih kot čistih kulturah (slika 18a, 18c, 19a in 19c). V čistih kulturah ni prišlo do sinteze vinilfenolov, produkcija etilfenolov pa je bila visoka. Sev ZIM 702 je v teh pogojih sintetiziral 21,5 mg/L 4-EF in 30,4 mg/L 4-EG, sevi ZIM 2512, ZIM 700 in ZIM 706 pa so sintetizirali okoli 35 mg/L 4-EF in od 43 mg/L do 47 mg/L 4-EG. Sev ZIM 703 je v čisti kulti tvoril kar 49,1 4-EF in 38,3 mg/L 4-EG. V mešanih kulturah so sevi ZIM 2512, ZIM 703, ZIM 700, ZIM 706 in ZIM 702 proizvedli okoli 10 mg/L 4-VF in okoli 7 mg/L 4-VG, produkcija etilfenolov pa je močno upadla, in sicer na okoli 3 mg/L 4-EG in na 0 mg/L 4-EF (slika 18 in 19).

Pri dveh sevih pa smo opazili ravno obratni pojav. V čistih kulturah sta seva ZIM 1762 in ZIM 1764 v primerjavi z vsemi ostalimi sevi (ostalih 9 sevov) sintetizirala največjo količino vinilfenolov, in sicer je sev ZIM 1762 proizvedel kar 37,4 mg/L 4-VF in 21,4 mg/L 4-VG, sev ZIM 1764 pa 20,4 mg/L 4-VF in 7,8 mg/L 4-VG. Nadalje sta v čistih kulturah sintetizirala nizke koncentracije 4-EG (13,6 za sev 1764 in 3,2 za sev 1762), produkcija 4-EF pa je bila popolnoma odsotna. V mešanih kulturah je bila produkcija vinilfenolov bistveno nižja, pri čemer je na koncu fermentacije s sevom ZIM 1762 nastalo 23,3 mg/L 4-VF in 11,3 mg/L 4-VG, s sevom ZIM 1764 pa 12,9 mg/L 4-VF in 5,3 mg/L 4-VG (slika 18 in 19). V primerjavi s čistimi kulturami je potemtakem v mešanih fermentacijah prišlo do zmanjšanja produkcije vinilfenolov. Dodatno smo opazili, da v mešanih fermentacijah ni prišlo do produkcije etilfenolov.

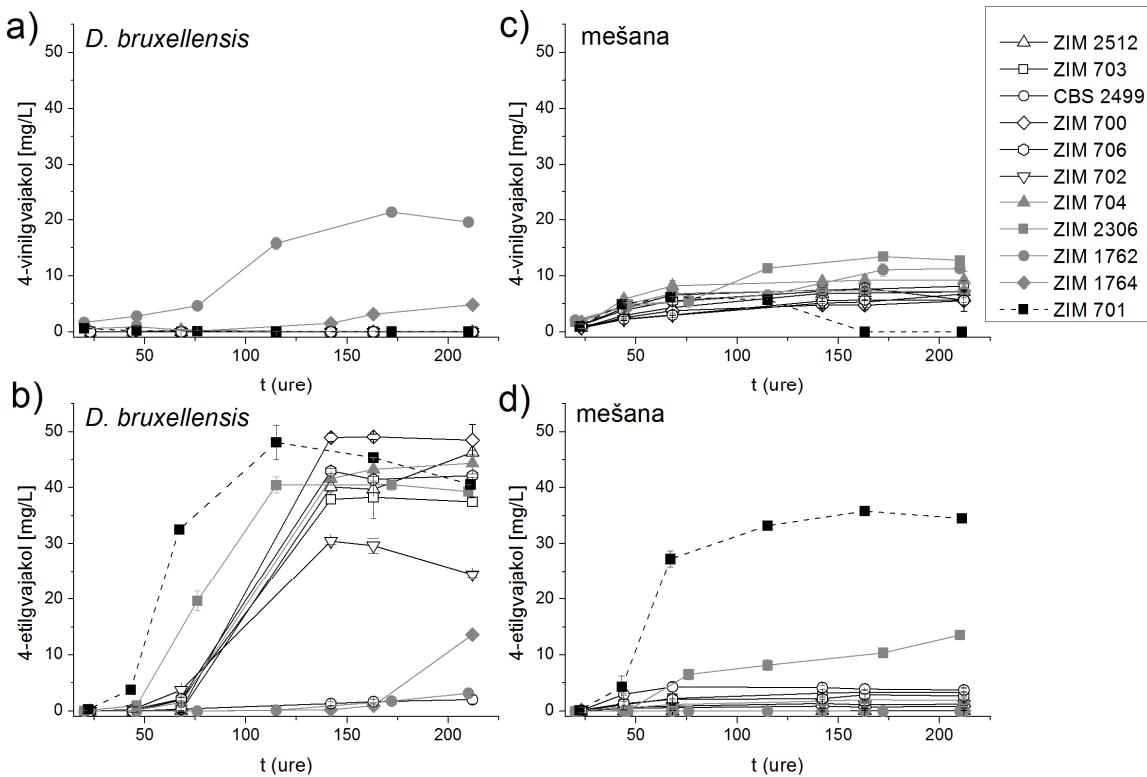
Iz rezultatov mešanih fermentacij je razvidno, da v primerjavi z vsemi ostalimi sevi, sev ZIM 701 najhitreje privzema vinilfenole in jih skoraj v celoti metabolizira do etilfenolov. Od vseh 11 sevov je bil sev ZIM 701 edini, ki je proizvedel več kot 30 mg/L 4-EG in 4-EF v mešanih fermentacijah (slika 18 in 19). Nadalje je v čistih fermentacijah najhitreje in v celoti pretvoril HCK v etilfenole.

Kljub temu da je bila rast seva CBS 2499 skorajda nična (slika 16a in 16b), pa je ta sev v čistih kulturah vseeno proizvedel 2,1 mg/L 4-EG in 1,1 mg/L 4-VF. Dodatno je v mešanih kulturah sintetiziral 5,7 mg/L 4-VG, 11,2 mg/L 4-VF in 4,2 mg/L 4-EG (slika 18 in 19).



**Slika 18: Producija 4-vinilfenola (a in c) in 4-etilfenola (b in d) med fermentacijo z 11 različnimi sevi kvasovke *D. bruxellensis* v čistih ali mešanih fermentacijah s kvasovko *S. cerevisiae* EC1118: a) in b) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* in c) in d) mešane fermentacije. Sevi, ki so označeni s sivimi simboli so v mešani ali v čisti kulturi sintetizirali največje količine vinilfenolov. Sevi, ki so označeni s praznimi simboli so v mešani ali v čisti kulturi sintetizirali manjše količine vinilfenolov. Kontrolni sev ZIM 701 je označen s črnim simbolum in s prekinjeno črto. Sintetični mošt MS300 je vseboval 100 mg/L hidroksicimetovih kislin. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah.**

Figure 18: Production of 4-vinylphenol (a and c) and 4-ethylphenol (b and d) during pure or in mixed culture fermentations of 11 different *D. bruxellensis* strains with *S. cerevisiae* strain EC1118: a) and b) pure culture fermentations with yeast *D. bruxellensis* and c) and d) mixed culture fermentations. Strains marked with gray symbols synthesized the highest quantities of vinylphenols in mixed or in pure culture fermentations. Strains marked with empty symbols synthesized the lowest quantities of vinylphenols in mixed or in pure culture fermentations. Control strain ZIM 701 is marked by a black symbol and a dashed line. Synthetic must MS300 contained 100 mg/L of hydroxycinnamic acids. Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.



**Slika 19:** Producija 4-vinilgvajakola (a in c) in 4-etilgvajakola (b in d) med fermentacijo z 11 različnimi sevi kvasovke *D. bruxellensis* v čistih ali mešanih fermentacijah s kvasovko *S. cerevisiae* EC1118: a) in b) fermentacije s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* in c) in d) mešane fermentacije. Sevi, ki so označeni s sivimi simboli so v mešani ali v čisti kulturi sintetizirali največje količine vinilfenolov. Sevi, ki so označeni s praznimi simboli so v mešani ali v čisti kulturi sintetizirali manjše količine vinilfenolov. Kontrolni sev ZIM 701 je označen s črnim simbolom in s prekinjeno črto. Sintetični mošt MS300 je vseboval 100 mg/L hidroksicimetovih kislin. Fermentacije so bile izvedene v 250 mL erlenmajericah.

Figure 19: Production of 4-vinylguaiacol (a and c) and 4-ethylguaiacol (b and d) during pure or in mixed culture fermentations of 11 different *D. bruxellensis* strains with *S. cerevisiae* strain EC1118: a) and b) pure culture fermentations with yeast *D. bruxellensis* and c) and d) mixed culture fermentations. Strains marked with gray symbols synthesized the highest quantities of vinylphenols in mixed or in pure culture fermentations. Strains marked with empty symbols synthesized the lowest quantities of vinylphenols in mixed or in pure culture fermentations. Control strain ZIM 701 is marked by a black symbol and a dashed line. Synthetic must MS300 contained 100 mg/L of hydroxycinnamic acids. Fermentations were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 VPLIV KVASOVKE *D. bruxellensis* NA METABOLIZEM KVASOVKE *S. cerevisiae* IN NA KONČNO AROMO VINA V MEMBRANSKO LOČENIH KULTURAH

V tem delu bomo komentirali in razložili rezultate vpliva kvasovke *D. bruxellensis* na metabolizem aromatskih snovi kvasovke *S. cerevisiae* in na izražanje genoma kvasovke *S. cerevisiae*.

#### 5.1.1 Rast kvasovk in fermentacijska kinetika v fermentacijah z mešano, membransko ločeno ali čisto kulturo

Tako stopnja rasti biomase kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* kot tudi poraba sladkorjev in produkcija alkoholov so bile podobne tako v membransko ločenih kulturah kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* izvedenih v membranskih bioreaktorjih kot v 250 mL erlenmajericah z mešano kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* (slika 4, 5 in 7). To dokazuje primernost uporabljenih membranskih bioreaktorjev (slika 3) za simulacijo in preučevanje fermentacije v mešanih kulturah različnih vrst kvasovk.

Naša raziskava se sklada z opažanji, ki so jih naredili Sáez in sod. (2010), da mešane/membransko ločene fermentacije s kvasovko *D. bruxellensis* ne vplivajo na kinetiko rasti kvasovke *S. cerevisiae* (slika 4b, 7a in 7c). Za razliko od tega pa je prisotnost alkoholne fermentacije, ki jo je vodila kvasovka *S. cerevisiae*, pozitivno spodbudila rast kvasovke *D. bruxellensis*. Ugotovili smo namreč, da je bila znotraj mešanih/membransko ločenih fermentacij eksponentna faza rasti kvasovke *D. bruxellensis* (ZIM 701) za 0,5  $\log_{10}$ CFU/mL večja v primerjavi z njeno eksponentno fazo rasti v fermentacijah s čisto kulturo te kvasovke (slika 4b, 7b in 7c). To pospešitev rasti kvasovke *D. bruxellensis* v prisotnosti kvasovke *S. cerevisiae* je mogoče pojasniti z dejstvom, da imajo visoke koncentracije glukoze negativni vpliv na rast kvasovke *D. bruxellensis*, kar je bilo nedavno tudi dokazano (Leite in sod., 2012). Znano je, da kvasovka *D. bruxellensis* v prisotnosti visokih koncentracij glukoze kaže relativno nizko stopnjo rasti v primerjavi z drugimi vinski kvasovkami (Dias in sod., 2003). Nadalje je poznano, da je prevzem sladkorjev s strani kvasovk *Brettanomyces* spp. zelo nizek še zlasti v primeru rasti teh kvasovk v gojišču z visoko koncentracijo glukoze (Van Urk in sod., 1989). Potemtakem je v mešanih/membransko ločenih kulturah s kvasovkama *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* prišlo do popolne porabe glukoze že po 100 urah fermentacije s strani kvasovke *S. cerevisiae*, kar je posledično omogočilo kvasovki *D. bruxellensis*, da raste hitreje.

Ne glede na rastno krivuljo, pa je bila končna biomasa kvasovke *D. bruxellensis* v čistih kulturah za 0,5  $\log_{10}$ CFU/mL večja od končne biomase v mešanih/membransko ločenih fermentacijah. To je lahko posledica primanjkovanja hrani (na primer aminokislin) v mešanih/membransko ločenih fermentacijah ali bolj verjetno posledica nakopičenja visokih koncentracij etanola.

Nadalje kvasovka *D. bruxellensis* v mešanih/membransko ločenih fermentacijah ni imela vpliva na prevzem fruktoze in glukoze ali na proizvodnjo etanola (slika 5). Čeprav je bila v čistih kulturah sposobna sintetizirati do 18,9 g/L etanola, pa je bila njena produkcija etanola v mešanih/membransko ločenih fermentacijah prepočasna, da bi lahko kakorkoli vplivala na hitro sintezo etanola v kvasovke *S. cerevisiae*. Kljub temu pa je vplivala na zmanjšano produkcijo glicerola v mešanih/membransko ločenih fermentacijah (slika 6). Nižja proizvodnja glicerola v mešanih/membransko ločenih kulturah v primerjavi s čistimi kulturami kvasovke *S. cerevisiae* bi lahko pomenila, da je kvasovka *D. bruxellensis* med fermentacijo za vir ogljika izrabljala glicerol, ki pa ga je predhodno proizvedla in v gojišče sprostila kvasovka *S. cerevisiae*. Ne glede na resničnost ali neresničnost te hipoteze, smo vendarle ugotovili, da je kvasovka *D. bruxellensis* v čisti kulti sposobna privzemati glicerol iz umetnega mošta MS300, ki ni vseboval sladkorjev in je bil dopolnjen z 10 g/L glicerola. V teh pogojih je kvasovka *D. bruxellensis* prevzela 0,85 g/L glicerola. Ne glede na vse pa to ne dokazuje, da je kvasovka *D. bruxellensis* bila odgovorna za prevzem glicerola v mešanih/membransko ločenih fermentacijah s kvasovko *S. cerevisiae* v umetnem moštu MS300 dopolnjenem z glukozo in fruktozo.

### **5.1.2 Producija hlapnih fenolov v fermentacijah z mešano, membransko ločeno ali čisto kulturo**

Producija hlapnih fenolov je bila podobna tako v membransko ločenih kulturah kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* izvedenih v membranskem bioreaktorjih kot v 250 mL erlenmajericah z mešano kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* (slika 8). To dokazuje primernost uporabljenih membranskih bioreaktorjev za preučevanje proizvodnje vinilnih in etilnih fenolov v mešanih kulturah različnih vrst kvasovk.

V fermentacijah s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis* ZIM 701, je prišlo do hitrega privzema HCK in do popolne znotrajcelične pretvorbe vinilfenolov do etilfenolov. Po drugi strani pa je v mešanih/membransko ločenih kulturah prišlo do zakasnitve v pretvorbi in do 30 % zmanjšanja v nastanku etilfenolov (slika 8). Potemtakem se zdi, da je proizvodnja etilfenolov hitrejša, ko kvasovka *D. bruxellensis* privzema HCK in jih znotrajcelično dekarboksilira do vinilfenolov v primerjavi z neposrednim privzemom vinilfenolov iz umetnega mošta. Torej v mešanih/membransko ločenih kulturah sama pretvorba HCK v vinilfenole s strani kvasovke *S. cerevisiae* negativno vpliva na končno produkcijo etilfenolov znotraj kvasovke *D. bruxellensis*. Dodatno smo v mešanih fermentacijah opazili rahlo zmanjšanje v izražanju gena *VPR* (0,69-krat) v primerjavi z izražanjem v čistih kulturah kvasovke *D. bruxellensis* (slika 11). To zmanjšanje bi lahko bila posledica nižje razpoložljivosti znotrajceličnega substrata (prevzetih HCK) v mešanih fermentacijah. V teh fermentacijah je *D. bruxellensis* 701 začela asimilirati vinilfenole šele po 70 urah inkubacije, ko je koncentracija vinilfenolov v moštu že dosegla ali presegla tiste, ki smo jih izmerili v čistih kulturah kvasovke *S. cerevisiae*. Ker biosinteza etilfenolov večinoma poteka v eksponentni faziji rasti kvasovke *D. bruxellensis*, je bil tisti delež HCK, ki ga je kvasovka *S. cerevisiae* pretvorila do vinilfenolov, manj dostopen za prevzem s kvasovko *D. bruxellensis*. Posledično je raven znotrajceličnih vinilfenolov upadla in proizvodnja etilfenolov je stagnirala. V skladu s tem so nekatere študije pokazale, da je proizvodnja etilfenolov tesno povezana z eksponentno fazo rasti kvasovke *D. bruxellensis*.

in da se njihova biosinteza popolnoma ustavi ob prehodu te kvasovke v stacionarno fazo rasti (Barata in sod., 2008b; Agnolucci in sod., 2009).

### 5.1.3 Transkriptomska analiza

V membransko ločenih kulturah (v membranskih bioreaktorjih) je prisotnost kvasovke *D. bruxellensis* statistično značilno spodbudila izražanje 77 transkriptov v kvasovki *S. cerevisiae* (preglednica 32). Analiza genske ontologije je pokazala, da je kar 70,1 % teh transkriptov (54 ORF-ov) biološko neopisanih in da zanje ni poznanih bioloških funkcij. Do podobnih ugotovitev so prišli Rossouw in sod. (2011), ko so preučevali vpliv mlečnokislinske bakterije *Oenococcus oeni* na izražanje genov v kvasovki *S. cerevisiae* med mešano fermentacijo. V tej študiji so odkrili, da kar 25 % vseh diferencialno izraženih genov kvasovke *S. cerevisiae* (1,5 kratna mejna vrednost izražanja) nima nobene poznane biološke funkcije in ne spada v noben okarakterizirani biološki proces. Roussouw in sod. (2011) so prišli do zaključka, da je merjenje opaznih fenotipov posameznih genov, ki sodelujejo v interakcijah med različnimi mikroorganizmi, težko in zapleteno. Potemtakem se zdi, da nekateri odprtih bralnih okvirji, ki bi lahko bili so- udeleženi v mikrobnih interakcijah, še nimajo okarakterizirane biološke funkcije.

25,9 % (14 ORF-ov) transkriptov z neznano biološko funkcijo je pripadalo genski družini *PAU* (s 3,3-kratnim povprečnim izražanjem). Čeprav članom te genske družine še niso pripisali biološke funkcije, obstajajo študije, ki predpostavljajo njihovo vpletenost v anaerobiozni stresni odziv kvasovke *S. cerevisiae*, še zlasti v pogojih vinske fermentacije pri nizkih temperaturah (Rachidi in sod., 2000; Lai in sod., 2006; Luo in van Vuuren, 2009).

Za 12 od 14 transkriptov *PAU*, katerih izražanje se je povečalo v naši raziskavi, so Lai in sod. (2006) ugotovili, da so pozitivno regulirani tekom prilagoditve kvasovke *S. cerevisiae* na anaerobiozni stres. Dodatno smo za transkripte *IZH4* (2,1-krat), *STR3* (2,1-krat), *YSR3* (2,1-krat), *MUPI* (2,1-krat), *PLB2* (3,0-krat) in *YMR252C* (2,0-krat) kvasovke *S. cerevisiae* ugotovili, da je njihovo izražanje spodbujeno tako v pogojih membransko ločenih kultur s kvasovko *D. bruxellensis* kot v pogojih prilaganja kvasovke *S. cerevisiae* na anaerobiozni stres (Lai in sod., 2006).

Tako visoko prekrivanje genov, čigar izražanje se je povečalo v membransko ločeni kulturi kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* z geni, ki so bili inducirani tekom anaerobioze (kar 23,4 % oziroma kar 18 od 77 transkriptov s povečanim izražanjem), kaže na to, da v membransko ločenih fermentacijah poteka tekmovanje obeh vrst kvasovk za prevzem molekularnega kisika in da so v membransko ločenih kulturah hipoksični pogoji bolj izraziti v primerjavi s fermentacijami s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae*.

Poleg tega predvidevamo, da so anaerobne razmere v membransko ločenih kulturah ovirale proizvodnjo nenasičenih maščobnih kislin in sterolov, ki so bistveni za ohranitev integrите plazmaleme in za odpornost kvasovk na etanol ter na ostale fermentacijske pogoje (Rosenfeld in sod., 2003). V skladu s tem smo opazili povečano izražanje naslednjih transkriptov: *PAU21* (2,9-krat), *STR3*, *MTR4* (2,6 -krat), *YJL150W* (2,4-krat) in *YMR252C*, ki so vpleteni v odziv kvasovke *S. cerevisiae* na fermentacijski stres (Marks in

sod., 2008); transkriptov *PLB2*, *IZH1* (2,3-krat), *IZH4* in *YSR3*, ki so vpletene v metabolizem lipidov in transkriptov *YLR225C* (2,3-krat), *SPG4* (2,4-krat), *CTT1* (2,5-krat) in *THI11* (7,9-krat), ki so vpletene v osmotski stres kvasovke v prisotnosti povečanih koncentracij sladkorjev (Erasmus in sod., 2003). Torej slabša intergiteta celične membrane v membransko ločenih fermentacijah bi potemtakem povzročila večjo izpostavljenost kvasovke *S. cerevisiae* stresnim fermentacijskim pogojem, kot so etanol in osmotski stres. Iz tega lahko sklepamo, da je v membransko ločenih fermentacijah prišlo do povečanega izražanja zgoraj predstavljenih skupin transkriptov.

Od vseh 77 transkriptov je bila genska družina za biosintezo tiamina (THI5 (6,3-krat), THI11, THI12 (6,4-krat), THI13 (7,7-krat) in THI22 (3,6-krat)) najmočneje izražena v fermentacijah z membransko ločeno kulturo. Povečanje izražanja THI genov in genov, ki kodirajo permeaze za transport putrescina (*UGA4*, 2,3-krat) in metionina (*MUP1*), kaže na možnost tekmovanja obeh vrst kvasovk za žveplo in dušik vsebujoče aminokisline, vitamine in poliamine. Uscanga in sod. (2000) so pokazali, da ima kvasovka *D. bruxellensis* visoke potrebe po žveplu in dušiku, kar direktno podpira našo hipotezo o tekmovanju za substrate, ki vsebujejo ta dva elementa.

Tekom membransko ločenih fermentacij smo opazili tudi povečano izražanje genov, ki so povezani z aktivacijo mejoze (*IME2*, 2,8-krat), z regulacijo (*KCC4*, 3,1-krat) in konstrukcijo (*SPR28*, 2,1-krat) septinov in z napredovanjem mejoze (*GMC2*, 2,2-krat). To lahko pojasnimo z dejstvom, da se spolni cikel kvasovke *S. cerevisiae* sproži v primeru pomanjanja hranilnih snovi, ki vsebujejo dušik (Gustin in sod., 1998).

#### 5.1.4 Analiza aromatskih snovi

Analiza izražanja genov je pokazala, da čeprav so bile celice obeh vrst kvasovk fizično ločene druga od druge, so metaboliti, ki jih je tvorila kvasovka *D. bruxellensis* inducirali izražanje 77 transkriptov v kvasovki *S. cerevisiae*. Ne glede na to pa lahko posledice mikrobnih interakcij in mikrobne kompeticije predstavimo le z metabolnimi dejavnostmi teh dveh vrst kvasovk.

Prisotnost kvasovke *D. bruxellensis* v membransko ločenih kulturah je močno vplivala na metabolizem aromatskih snovi kvasovke *S. cerevisiae*, pri čemer je prišlo do statistično značilnih sprememb v akumulaciji estrov, višjih alkoholov in maščobnih kislin (preglednica 33). Sinteza acetatnih estrov in višjih alkoholov se je v večini primerov zmanjšala v fermentacijah z membransko ločeno kulturo. Za razliko od teh pa je bila produkcija večine etilnih estrov in maščobnih kislin znatno povečana v membransko ločenih kulturah.

Povečana proizvodnja izovalerne, heksanojske in dekanajske kisline je bila posledica kumulativne proizvodnje teh kislin s strani obeh vrst kvasovk hkrati. Seštevek opaženih akumulacij teh kislin v čisti kulturi kvasovke *D. bruxellensis* in v čisti kulturi kvasovke *S. cerevisiae* se namreč ujema s količino kislin, ki smo jih izmerili v membransko ločenih kulturah. Poznano je, da je kvasovka *D. bruxellensis* sposobna biosintetizirati in izločati izovalerno, heksanojsko in dekanajske kisline (Romano in sod., 2008).

V kvasovki *S. cerevisiae* je sinteza etilnih estrov maščobnih kislin večinoma omejena le s koncentracijo maščobnih kislin (prekurzorske molekule za sintezo etilnih estrov maščobnih kislin) in ni odvisna od stopnje izraženosti genov *EEB1* in *EHT1*, ki kodirata glavni aciltransferazi v biosintezni poti etilnih estrov (Saerens in sod., 2008). V skladu s tem, naša transkriptomska analiza ni pokazala statistično značilnih sprememb v izražanju genov *EEB1* in *EHT1* v membransko ločenih in čistih kulturah kvasovke *S. cerevisiae*.

Ker pa je bila produkcija etilnih estrov v membransko ločenih kulturah zelo močno izražena, njihove visoke sinteze ni mogoče v celoti pojasniti le z enostavnim kumulativnim delovanjem obeh kvasovk pri zagotavljanju prekurzorskih maščobnih kislin. Iz povečanega izražanja genov *PAU* smo predpostavili, da je v membransko ločenih kulturah prisotnega manj kisika v primerjavi s fermentacijami s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae*. Izrazitejše redukcijske razmere (anaerobne razmere) v membransko ločenih kulturah bi lahko pojasnile, zakaj je prišlo do povečanja v sintezi etilnih estrov ter do zmanjšanja v sintezi višjih alkoholov v kvasovki *S. cerevisiae*. V nedavni študiji so Fariña in sod. (2012) poročali, da so anaerobne razmere statistično značilno povečale proizvodnjo estrov in maščobnih kislin ter zmanjšale proizvodnjo višjih alkoholov in izokislin v vinskih fermentacijah s čisto kulturo kvasovke *S. cerevisiae*. Z izjemo acetatnih estrov in izokislin so bili rezultati te študije podobni našim. Ti avtorji menijo, da je povečanje v proizvodnji maščobnih kislin in etilnih estrov lahko povezano z dejstvom, da je delovanje encima acetil-CoA-karboksilaze, kvasovke *S. cerevisiae*, inhibirano v prisotnosti hipoksičnih pogojev. To vodi do zaviranja sinteze nenasičenih maščobnih kislin ali do zaviranja sinteze membranskih sterolov in posledično do nakopičenja kratkih in srednje verižnih maščobnih kislin (Saerens in sod., 2010; Fariña in sod., 2012). Biosinteza etilnih estrov maščobnih kislin je najbolj odvisna od koncentracije kratkih in srednje verižnih maščobnih kislin. Torej lahko kopiranje teh maščobnih kislin (zaradi inhibiranega delovanja encima acetil-CoA-karboksilaze) neposredno inducira produkcijo pripadajočih etilnih estrov.

Zmanjšanje v nastanku višjih alkoholov je mogoče razložiti z razpoložljivostjo aminokislin, saj je znano, da so višjih alkoholi sekundarni metaboliti, ki nastanejo tekom katabolizma aminokislin v kvasovki *S. cerevisiae* (Dickinson in sod., 1998; Hazelwood in sod., 2008). Iz povečanega izražanja gena *MUP1*, ki kodira permeazo za žveplo vsebujoče aminokisline, smo predpostavili, da je v membransko ločenih kulturah prisotno tekmovanje za aminokisline, ki vsebujejo žveplo in dušik. Zaradi tekmovanja med kvasovkami lahko pride do slabše razpoložljivosti aminokislin v gojišču, kar pa lahko posledično negativno vpliva na sintezo višjih alkoholov.

Biosinteza acetatnih estrov poteka po poti esterifikacije višjih alkoholov z ocetno kislino. Zato bi lahko z nižjo razpoložljivostjo višjih alkoholov v membransko ločenih kulturah pojasnili upad v akumulaciji acetatnih estrov.

## 5.2 VPLIV PREKURZORSKIH MOLEKUL, ETANOLA IN RAZLIČNIH SEVOV KVASOVKE *D. bruxellensis* NA BIOSINTEZO IN AKUMULACIJO Hlapnih FENOLOV V MEŠANIH FERMENTACIJAH S KVASOVKO *S. cerevisiae*

V tem delu bomo komentirali in razložili rezultate vpliva prekurzorskih molekul, etanola in različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* na gene, ki kodirajo biosintezne encime za hlapne fenole in na samo akumulacijo hlapnih fenolov med mešanimi fermentacijami s kvasovko *S. cerevisiae*.

### 5.2.1 Vpliv prekurzorskih molekul v mešanih fermentacijah

Zamenjava 100 mg/L HCK z 100 mg/L vinilfenolov je občutno zmanjšala rast kvasovke *S. cerevisiae*. Čeprav je zamenjava negativno vplivala tudi na rast kvasovke *D. bruxellensis* 701 pa je bil ta vpliv bistveno manjši v primerjavi s kvasovko *S. cerevisiae* (slika 7). To je mogoče posledica večje odpornosti kvasovke *D. bruxellensis* na višje koncentracije vinilfenolov.

Iz literature je poznano, da mikroorganizmi dekarboksilirajo HCK z namenom, da bi proizvedli manj toksične spojine (Goodey in Tubb, 1982). Presenetljivo so Hammond in sod. (1999) v poskusih fermentacije piva opazili, da je 4-VG bolj zaviral rast kvasovk *Saccharomyces* in *Dekkera* spp. v primerjavi s ferulno kislino. Ti avtorji trdijo, da so mikroorganizmi, ki vsebujejo encim kumarat-dekarboksilazo in ne vsebujejo encima vinilfenol-reduktaze (na primer kvasovka *S. cerevisiae*), še veliko bolj občutljivi na protimikrobnno delovanje ferulne kisline. Razlog zato vidijo prav v njihovi zmožnosti pretvorbe ferulne kisline v bolj toksični 4-VG in v njihovi nezmožnosti detoksifikacije 4-VG v 4-EG.

V fermentacijah s čisto kulturo kvasovke *D. bruxellensis*, smo opazili popolno asimilacijo eksterno dodanih vinilfenolov in le 65 % pretvorbo do etilfenolov (slika 10c in 10d). Zamenjava HCK z vinilfenoli je spodbudila izražanje genov *KKD* in *VPR* v kvasovki *D. bruxellensis* (slika 15a). To je zanimivo, saj nakazuje na to, da bi lahko bile dekarboksilaze in reduktaze bolj odzivne na vinilfenole v primerjavi s HCK. To bi lahko namigovalo na večjo citotoksičnost vinilfenolov, ki smo jo opazili v naši raziskavi in na potrebo po njihovi takojšnji pretvorbi do manj toksičnih produktov (na primer do etilfenolov).

Naše opažanje, da se izražanje gena *KKD* poveča tudi v prisotnosti vinilfenolnih prekurzorjev, ni presenetljivo, saj so Godoy in sod. (2008) pokazali, da se aktivnost kumarat-dekarboksilaze poveča tako ob dodajanju *p*-kumarne kisline kot tudi ob dodajanju 4-VF. Nizko raven produkcije etilfenolov iz vinilfenolnih prekurzorjev v primerjavi s HCK lahko delno obrazložimo z negativnim vplivom vinilfenolov na rast kvasovke *D. bruxellensis* in z njenim počasnejšim privzemom vinilfenolov v znotrajcelični prostor. Počasen prevzem vinilfenolov kvasovke *D. bruxellensis* je bil še zlasti očiten v mešanih fermentacijah (slika 10e). Posledično je bila proizvodnja etilfenolov v primerjavi z čistimi kulturami kvasovke *D. bruxellensis* 701 močno zmanjšana (slika 10d).

### 5.2.2 Vpliv etanola v mešanih fermentacijah

Dodajanje 10 % etanola je močno zmanjšalo rast in proizvodnjo hlapnih fenolov kvasovk *D. bruxellensis* 701 in *S. cerevisiae* (slika 12-14). Pri obeh kvasovkah se je pojavila lag faza, vendar je bila za kvasovko *D. bruxellensis* izrazito daljša v primerjavi s kvasovko *S. cerevisiae* (slika 12). V skladu z našimi ugotovitvami so Barata in sod. (2008a) pokazali, da je kvasovka *S. cerevisiae* razmeroma bolj odporna na etanol kot pa kvasovka *D. bruxellensis*. Dodatno so Barbin in sod. (2008) opazili dolgo lag fazo za devet sevov vrste *D. bruxellensis* po inkubaciji v sintetičnem vinu, ki je v skupni koncentraciji vseboval 10 % etanola.

Poleg tega smo opazili, da je v mešanih kulturah dopolnjenih z nizkimi koncentracijami etanola, rast kvasovke *D. bruxellensis* proti koncu inkubacije upadla (slika 12c). To je bilo pričakovano, saj je kvasovka *S. cerevisiae* s fermentacijo sladkorjev proizvedla okoli 9,5 % etanola (koncentracijo etanola smo ocenili iz absolutne spremembe v gostoti mošta, ki služi kot približna vrednost za ocenitev koncentracije sproščenega CO<sub>2</sub>) in skupaj z eksterno dodanim etanolom je lahko celokupna koncentracija alkohola presegla 10 %.

2,5 % koncentracija etanola je v fermentacijah z mešano in čisto kulturo povečala proizvodnjo vinilfenolov kvasovke *S. cerevisiae* in etilfenolov kvasovke *D. bruxellensis* (slika 13 in 14). Z izjemo 4-VG je 5 % koncentracija etanola zavirala proizvodnjo hlapnih fenolov v obeh vrstah kvasovk inokuliranih v čisti kulti. V mešanih fermentacijah smo pri tej koncentraciji etanola opazili nadaljnjo pospešitev biosinteze etilfenolov, pri čemer je končna koncentracija etilfenolov presegla koncentracijo izmerjeno v kontrolnem moštu ali moštu, ki je bil dopolnjen s 2,5 % etanola. Naši rezultati kažejo, da je 2,5 % etanol pospešil izražanje gena *KKD* kvasovke *D. bruxellensis*, še zlasti v fermentacijah s čisto kulturo te kvasovke (slika 15b). V skladu s tem so Ganga in sod. (2011) pokazali, da je v primerjavi s kontrolnim gojiščem 3 % alkohol povečal aktivnost encima kumarat-dekarboksilaze in pospešil presnovo *p*-kumarne kisline v kvasovki *D. bruxellensis*. Poleg tega so Benito in sod. (2009) opazili, da je bila proizvodnja 4-EF v odsotnosti etanola počasnejša v primerjavi s fermentacijo v gojišču dopolnjenem s 5 % etanola.

### 5.2.3 Vpliv različnih sevov kvasovke *D. bruxellensis* v mešanih fermentacijah s kvasovko *S. cerevisiae*

Za vsakega od preučevanih sevov vrste *D. bruxellensis* smo odkrili, da je vseboval edinstven vzorec proizvodnje hlapnih fenolov. Na primer sev 1762 je akumuliral največjo koncentracijo vinilfenolov v čistih fermentacijah (slika 18 in 19), sev 2306 pa je v mešanih fermentacijah pokazal močan premik iz produkcije etilfenolov v produkcijo vinilfenolov (slika 18 in 19). Dodatno je sev 2306 akumuliral največjo koncentracijo vinilfenolov v mešanih fermentacijah. Preusmeritev iz produkcije etilfenolov v produkcijo vinilfenolov smo opazili tudi v mešanih fermentacijah s sevi ZIM 704, ZIM 2512, ZIM 703, CBS 2499, ZIM 700, ZIM 706 in ZIM 702.

Pri sevih ZIM 1762 in ZIM 1764 pa smo opazili ravno obratni pojavi. Omenjena seva sta v mešanih fermentacijah proizvedla manj vinilfenolov kot v fermentacijah s čisto kulturo.

Dodatno je presenetljivo, da kljub upadu v koncentraciji vinilfenolov v mešanih fermentacijah, ni prišlo do povečanja v koncentraciji etilfenolov. Razlogov za ta pojav je lahko več, in sicer od sevno specifičnih induktorjev izražanja gena VPR, do sevno specifičnih lastnosti celične stene kvasovk, ki lahko v svoj volumen adsorbirajo etilfenole.

Za sev ZIM 701 smo ugotovili, da v primerjavi z vsemi ostalimi obravnavanimi sevi, najhitreje privzema vinilfenole v mešanih fermentacijah in jih skoraj v celoti metabolizira do etilfenolov. Od vseh 11 sevov je bil sev ZIM 701 edini, ki je v mešanih fermentacijah proizvedel več kot 30 mg/L 4-EG ter več kot 30 mg/L 4-EF. Nadalje je v čistih fermentacijah najhitreje in v celoti pretvoril HCK v etilfenole.

Ostali sevi, ki so v čisti kulturi proizvajali velike koncentracije etilfenolov (nad 30 mg/L) so bili: ZIM 2306, ZIM 704, ZIM 703, ZIM 700, ZIM 2512 in ZIM 706. Srednje velike koncentracije (okoli 20 mg/L) etilfenolov je v čisti kulturi proizvajal samo sev ZIM 702. Nizke koncentracije etilfenolov (manj kot 15 mg/L) so v čisti kulturi sintetizirali le sevi ZIM 1762, ZIM 1764 in CBS 2499.

Za 7 sevov od 11 (ZIM 704, ZIM 2512, ZIM 703, CBS 2499, ZIM 700, ZIM 706 in ZIM 702) je produkcija etilfenolov močno upadla v mešanih fermentacijah v primerjavi s čistimi fermentacijami. V primeru teh 7 sevov se je produkcija zmanjšala za kar 80 do 90 %. Tako močnega upada v koncentraciji etilfenolov nismo pričakovali. Glede na te rezultate lahko v splošnem sklepamo, da je pojav etilfenolov pogosteji v primeru zaostalih fermentacij, v katerih je rast vinske kvasovke *S. cerevisiae* močno zavrta in večino biomase tvorijo sevi kvasovke *D. bruxellensis*. Torej v fermentacijah, v katerih po količini nastale biomase prevladuje kvasovka *D. bruxellensis*.

V primeru večine sevov (ZIM 704, ZIM 2512, ZIM 703, ZIM 700, ZIM 706 in ZIM 702) je bila proizvodnja hlapnih fenolov neposredno povezana z njihovo rastjo, to pa zato ker je bila večina hlapnih fenolov proizvedenih med eksponentno fazo rasti celic. To je veljalo predvsem za fermentacije s čisto kulturo teh kvasovk. Vseeno pa korelacija med rastjo in produkcijo ni bila linearна. Na primer sev ZIM 702 je tvoril le srednje velike koncentracije etilfenolov, čeprav je bila njegova stopnja rasti biomase zelo visoka.

Dodatno sta počasi rastoča seva ZIM 1762 in ZIM 1764 v čisti kulturi v primerjavi z vsemi ostalimi sevi (ostalih 9 sevov) sintetizirala največjo količino vinilfenolov. Vinilfenole sta pričela izločati takoj po prehodu iz 70 ur trajajoče lag faze prilagajanja rasti. Ugotovili smo tudi, da je sev CBS 2499, kljub 150 ur trajajoči lag fazi, v čisti kulturi proizvedel 2,1 mg/L 4-EG in 1,1 mg/L 4-VF, v mešani kulturi pa 5,7 mg/L 4-VG, 11,2 mg/L 4-VF in 4,2 mg/L 4-EG. V obeh vrstah fermentacije je bila koncentracija nastalega 4-EG zadostna, da bi lahko negativno vplivala na aromatski profil vina. Naša opažanja se skladajo z opažanjami v vinarstvu. Pogosto se namreč zgodi, da pokvarjena vina z visoko koncentracijo 4-etilfenola, ne kažejo vidne rasti kvasovke *D. bruxellensis*. Po drugi strani pa lahko vina z visoko stopnjo rasti kvasovke *D. bruxellensis* vsebujejo le srednje ali majhne količine etilfenolov (Barbin in sod., 2008).

Naša opažanja potrjujejo tudi domnevo, da bi v mešanih fermentacijah s sevom ZIM 2306 lahko obstajala korelacija med citotoksičnimi učinkti vinilfenolov in med upadanjem v rasti

kvasovke *S. cerevisiae*. V tem primeru je prišlo do nakopičenja visokih koncentracij 4-VF (slika 18c), kar bi proti koncu fermentacije lahko posledično vplivalo na zmanjšanje rasti kvasovke *S. cerevisiae* (slika 16c).

## 6 SKLEPI

V doktorski nalogi smo uspeli odgovoriti na obe raziskovalni hipotezi:

- kontaminacija s kvasovko *D. bruxellensis* vpliva na biosintezo aromatskih alkoholov in hlapnih fenolov v vinu.

V membransko ločenih fermentacijah je kvasovka *D. bruxellensis* spodbudila proizvodnjo etilnih estrov in maščobnih kislin. Nadalje je vplivala na nižjo produkcijo acetatnih estrov in aromatskih (višjih) alkoholov. Dodatno je prisotnost alkoholne fermentacije, ki jo je vodila kvasovka *S. cerevisiae*, vplivala na znižanje biosinteze etilnih fenolov kvasovke *D. bruxellensis*. Prisotnost kvasovke *D. bruxellensis* je sprožila izražanje 77 genov kvasovke *S. cerevisiae*. Ti geni so bili večinoma vpleteni v odziv kvasovke *S. cerevisiae* na anaerobiozni stres. Predvidevamo, da sta obe vrsti kvasovk med potekom membransko ločenih fermentacij tekmovali za molekularni kisik, pri čemer je prišlo do bolj izrazitih anaerobnih razmer. Nastale redukcijske razmere v membransko ločenih fermentacijah niso vplivale zgolj na integriteto celične membrane in na povečan stres v kvasovki *S. cerevisiae*, ampak tudi na povečano sintezo etilnih fenolov kvasovke *S. cerevisiae*.

Nadalje so transkriptomske analize nakazale, da je poleg tekmovanja za kisik prisotno še tekmovanje za vitamine (tiamin) in žveplo vsebujoče aminokisline. Torej lahko rečemo, da je kompeticija prevladujoča mikrobnna interakcija med kvasovkama *D. bruxellensis* in *S. cerevisiae*.

- prekurzorske molekule in substrati povečajo produkcijo hlapnih fenolov in višjih (aromatskih) alkoholov med mešano fermentacijo kvasovk.

Ugotovili smo, da imajo vinilfenoli, v primerjavi s HCK, citotoksični vpliv na obe vrsti kvasovk, še zlasti na kvasovko *S. cerevisiae*. Njihova prisotnost je močno zmanjšala sintezo etilnih fenolov kvasovke *D. bruxellensis*. Zanimivo je, da v mešanih fermentacijah, kvasovka *D. bruxellensis* skoraj da ni privzemala eksterno dodanih vinilnih fenolov. Vinilni fenoli so, v primerjavi s HCK, močno spodbudili izražanje tistih genov (*KKD* in *VPR*) kvasovke *D. bruxellensis*, ki kodirajo encime za biosintezo hlapnih fenolov. Potemtakem so ti encimi bolj odzivni na vinilfenole v primerjavi s HCK. To dodatno potrjuje dejstvo, da je njihova citotoksičnost močnejša od HCK.

Dodatno smo pokazali, da so nizke koncentracije etanola vplivale na povečanje sinteze vinilnih in etilnih fenolov. To je še posebej prišlo do izraza v mešanih fermentacijah. Njihov pozitivni učinek smo potrdili z analizo PCR RČ, pri čemer smo ugotovili, da so nizke koncentracije alkohola spodbudile izražanje gena *KKD* v kvasovki *D. bruxellensis*.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

Kontaminacija vina s kvasovko *Dekkera bruxellensis* med vinifikacijo se odrazi v motnosti in sintezi neprijetnih priokusov. Senzorični karakter teh priokusov je sestavljen iz vonja po mišjem urinu, po konjskem znoju, po dimljenosti in po razkuževalnih sredstvih. Glavne komponente odgovorne za senzorični kvar vina so hlapni fenoli, in sicer vinil- in etilfenoli. Na aroma vina vplivajo številne mikrobne interakcije med vinskimi mikroorganizmi kot so na primer: neutralizem, komenzalizem, mutualizem/sinergizem, amensalizem ali antagonizem in konkurenco. Zato je potrebno preučiti dinamiko sinteze hlapnih fenolov med potekom mešanih fermentacij s kvasovkama *D. bruxellensis* in *Saccharomyces cerevisiae*.

V nalogi smo testirali membranski bioreaktor, ki nam omogoča ločeno inkubacijo dveh različnih vrst kvasovk v skupni fermentaciji. Skozi prepustno membrano v bioreaktorju prosto prehajajo metaboliti, celice različnih vrst kvasovk pa ostajajo ločene. S takšno ločitvijo kultur kvasovk lahko konsistentno merimo vpliv določene vrste kvasovke na metabolizem druge vrste kvasovke in na končni aromatski profil vina. Nadalje smo privedili metodo tekočinske kromatografije za detekcijo in kvantifikacijo hlapnih fenolov kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Metoda nam omogoča določitev 4-vinilfenola, 4-vinilgvajakola, 4-etilfenola in 4-etilgvajakola. Razvili smo metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času za merjenje stopnje izražanja genov, ki so pomembni za sintezo hlapnih fenolov tako v kvasovki *S. cerevisiae* kot v kvasovki *D. bruxellensis*.

Ugotovili smo, da je prisotnost kvasovke *D. bruxellensis* močno vplivala na končni aromatski profil vina. Transkriptomske analize so pokazale, da v membransko ločenih kulturah obe vrsti kvasovk tekmujeta za prevzem kisika, vitaminov in žveplo vsebujočih aminokislin. To je privedlo do nižje vsebnosti teh hranil v membransko ločenih kulturah, kar pa je posledično vplivalo na celokupni aromatski profil vina. Tekmovanje za hidroksicimetove kisline je privedlo do upada v produkciji etilnih fenolov, tekmovanje za kisik pa je privedlo do povečanih redukcijskih razmer, ki so favorizirale proizvodnjo etilnih estrov in kratkoverižnih maščobnih kislin. Poleg mikrobne kompeticije so na aroma vina vplivali tudi vinilfenolni prekurzorji. Vinilfenoli so se izkazali za citotoksične molekule, ki zavirajo rast in produkcijo etilnih fenolov kvasovke *D. bruxellensis*. Analiza izražanja genov je pokazala, da sta gena, ki kodirata vinilfenol-reduktazo in kumarat-dekarboksilazo, močno spodbujena z vinilnimi fenoli, kar kaže na pomembnost hitre detoksifikacije vinilnih fenolov.

Visoke koncentracije etanola so zavrle rast in produkcijo hlapnih fenolov, nizke koncentracije pa so delovale ravno nasprotno. 2,5 % etanol je spodbudil izražanje gena *KKD* (kodira kumarat-dekarboksilazo) kvasovke *D. bruxellensis*, kar pa se je odrazilo tudi v povečani produkciji hlapnih fenolov.

## 7.2 SUMMARY

Contamination of wine with yeast *Dekkera bruxellensis* during vinification results in the synthesis of unpleasant flavours. Sensory character of these flavours is made up of the smells of mouse urine, horse sweat and disinfectants. The main components responsible for the production of unpleasant flavours in wines are volatile phenols, namely, vinyl- and ethyl- phenols. Wine aroma is strongly affected by microbial interactions between wine microorganisms. Some examples of such interactions are neutralism, commensalism, mutualism/synergism, amensalism or antagonism and competition. Therefore, it is important to study and understand the dynamics of the synthesis of volatile phenols during mixed cultures of yeasts *D. bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

During this study, we have developed a membrane fermenter, which allows us to separate two different types of yeast cells during wine fermentation. The permeable membrane allows for a free exchange of metabolites between the two yeasts, however the yeast cells remain separate during the incubation. With this separation of yeast cultures we can consistently measure the impact of a certain type of yeast on the metabolism of other yeasts and on the final aromatic profile of wine. Furthermore, we have developed a high-performance liquid chromatography method for the detection and quantification of volatile phenols. This method enables us to determine 4-vinylphenol, 4-vinylguaiacol, 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol. We have also developed a reverse transcription polymerase chain reaction protocol for measuring the level of expression of genes that are important for the synthesis of volatile phenols.

We have shown that the presence of yeast *D. bruxellensis* has a major impact on the final aromatic profile of wine. Transcriptomic analysis has shown that during the separated cultures both yeasts are competing for oxygen, sulfur-containing vitamins and amino acids. This competition has led to a lack of nutrients in the separated cultures, which has consequently affected the overall aromatic profile of wine. Competition for hydroxycinnamic acids has led to a decline in the production of ethyl phenol and the competition for oxygen has led to increased reductive conditions, which favour the production of ethyl esters and short chain fatty acids.

In addition to microbial competition, wine aroma was also influenced by vinyl phenol precursors. Vinyl phenols have proven to be cytotoxic and have shown to inhibit the growth and the production of ethyl phenols by yeast *D. bruxellensis*. Analysis of gene expression revealed that the genes encoding for vinyl phenol reductase and coumarate decarboxylase are strongly stimulated by vinyl phenol precursors. This indicates the importance for their rapid detoxification.

High concentrations of ethanol inhibited the growth and the production of volatile phenols. However, low concentrations stimulated the expression of gene *KKD* (encodes for a coumaric acid decarboxylase) and consequently promoted the production of volatile phenols.

## 8 VIRI

- Agilent one-color microarray-based gene expression analysis. 2008. San Jose, Agilent Technologies: 70 str. (Navodilo za uporabo)
- Agnolucci M., Vigentini I., Capurso G., Merico A., Tirelli A., Compagno C., Foschino R., Nuti M. 2009. Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. International Journal of Food Microbiology, 130, 3: 238-244
- Agnolucci M., Rea F., Sbrana C., Cristani C., Fracassetti D., Tirelli A., Nuti M. 2010. Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. International Journal of Food Microbiology, 143, 1-2: 76-80
- Andrews J., Gilliland R.B. 1952. A study of three organisms capable of causing abnormal attenuations. Journal of the Institute of Brewing, 58, 3: 189-196
- Anfang N., Brajkovich M., Goddard M.R. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in *Sauvignon Blanc*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 15, 1: 1-8
- Arvik T., Henick-Kling T. 2002. *Brettanomyces bruxellensis* occurrence, growth, and effect on wine flavor. Practical Winery & Vineyard, may/june 2002: 48-56
- Barata A., Nobre A., Correia P., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2006. Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. American Journal of Enology and Viticulture, 57, 2: 133-138
- Barata A., Caldeira J., Botelho R., Pagliara D., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2008a. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. International Journal of Food Microbiology, 121, 2: 201-207
- Barata A., Pagliara D., Piccininno T., Tarantino F., Ciardulli W., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2008b. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. FEMS Yeast Research, 8, 7: 1097-1102
- Barbin P., Cheval J.L., Gilis J.-F., Strehaino P., Taillandier P., Brew J.I. 2008. Diversity in spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* isolated from french red wine. Assessment during fermentation of synthetic wine medium. Journal of the Institute of Brewing, 114: 69-75
- Barthelmebs L., Divies C., Cavin J.F. 2000a. Knockout of the *p*-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. Applied and Environmental Microbiology, 66, 8: 3368-3375
- Barthelmebs L., Lecomte B., Divies C., Cavin J.-F. 2000b. Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an avtoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. Journal of Bacteriology, 182, 23: 6724-6731
- Barthelmebs L., Diviés C., Cavin J.F.C. 2001. Molecular characterization of the phenolic acid metabolism in the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*. Lait, 81, 1-2: 161-171
- Bely M., Sablayrolles J.M., Barre P. 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics: Its variability and significance. American Journal of Enology and Viticulture, 41, 4: 319-324

- Bely M., Stoeckle P., Masneuf-Pomarède I., Dubourdieu D. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* – *Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. International Journal of Food Microbiology, 122, 3: 312-320
- Benito S., Palomero F., Morata A., Calderón F., Suárez-Lepe J.A. 2009. Factors affecting the hydroxycinnamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera/Brettanomyces*: Application for *Dekkera/Brettanomyces* control in red wine making. Journal of Food Science, 74, 1: M15-M22
- Bisson L.F. 1999. Stuck and sluggish fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, 50, 1: 107-119
- Bisson L.F., Karpel J.E. 2010. Genetics of yeast impacting wine quality. Annual Review of Food Science and Technology, 1, 1: 139-162
- Boddy L., Wimpenny J.W.T. 1992. Ecological concepts in food microbiology. Journal of Applied Microbiology, 73, Suppl. S: 23S-38S
- Botelho G., Valiau C., Moreira da Silva A. 2011. Effect of cyclodextrins on off-odours removal of red wine: An innovative approach. Ciência e Técnica Vitivinícola, 26, 2: 63-68
- Cabrita M.J., Torres M., Palma V., Alves E., Pat R., Freitas A.M.C. 2008. Impact of malolactic fermentation on low molecular weight phenolic compounds. Talanta, 74: 1281-1286
- Calahorra M., Ramírez J., Mónica Clemente S., Peña A. 1987. Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeast plasma membrane. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 899, 2: 229-238
- Cao X., Cui Y., Liao X., Zhou G., Thamm L. 2010. Gene cloning of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis* and expression in top-fermenting yeast strain. Journal of Biotechnology, 9, 33: 5284-5291
- Carrasco P., Querol A. 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. Archives of Microbiology, 175, 6: 450-457
- Castelli T. 1955. Yeasts of wine fermentations from various regions of Italy. American Journal of Enology and Viticulture, 6, 1: 18-19
- Cavin J.-F., Dartois V., Divies C. 1998. Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 64, 4: 1466-1471
- Cavin J.F., Andioc V., Etievant P.X., Divies C. 1993. Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids. American Journal of Enology and Viticulture, 44, 1: 76-80
- Cavin J.F., Barthelmebs L., Divies C. 1997. Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. Applied and Environmental Microbiology, 63, 5: 1939-1944
- Chambel A., Viegas C.A., Sá-Correia I. 1999. Effect of cinnamic acid on the growth and on plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 50, 3: 173-179
- Charpentier C., Van Long T.N., Bonaly R., Feuillat M. 1986. Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. Applied Microbiology and Biotechnology, 24, 5: 405-413

- Chatonnet P., Boidron J.N., Pons M. 1990. Elebage des vins rouges en fûts de chêne: évolution de certains composés volatils et de leur impact arômatique. *Sciences des Aliments*, 10, 3: 565-587
- Chatonnet P., Dubourdie D., Boidron J.-N., Pons M. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 2: 165-178
- Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.-N., Lavigne V. 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 2: 191-202
- Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 4: 463-468
- Chatonnet P., Viala C., Dubourdieu D. 1997. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 4: 443-448
- Ciani M., Ferraro L. 1997. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 4: 489-495
- Ciani M., Beco L., Comitini F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 2: 239-245
- Clausen M., Lamb C.J., Megnet R., Doerner P.W. 1994. *PADI* encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 142, 1: 107-112
- Clemente-Jimenez J.M., Mingorance-Cazorla L., Martínez-Rodríguez S., Las Heras-Vázquez F.J., Rodríguez-Vico F. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 3: 301-308
- Conterno L., Joseph C.M.L., Arvik T.J., Henick-kling T., Bisson L.F. 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 139-147
- Couto J.A., Neves F., Campos F., Hogg T. 2005. Thermal inactivation of the wine spoilage yeasts *Dekkera/Brettanomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 3: 337-344
- Couto J.A., Campos F.M., Figueiredo A.R., Hogg T.A. 2006. Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 2: 166-171
- Curtin C.D., Bellon J.R., Coulter A.D., Cowey G.D., Robinson E.M.C., de Barros Lopes M.A., Godden P.W., Henschke P.A., Pretorius I.S. 2005. The six tribes of 'Brett' in Australia-distribution of genetically divergent *Dekkera bruxellensis* strains across Australian winemaking regions. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 20: 28-36
- Davis C.R., Wibowo D., Fleet G.H., Lee T.H. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 2: 137-142
- De Souza Liberal A.T., Basílio A.C.M., Do Monte Resende A., Brasileiro B.T.V., Da Silva-Filho E.A., De Morais J.O.F., Simões D.A., De Morais M.A. 2007. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 2: 538-547

- Degrassi G., Polverino De Laureto P., Bruschi C.V. 1995. Purification and characterization of ferulate and *p*-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1: 326-332
- Dias L., Pereira-da-Silva S., Tavares M., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2003. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, 20, 4: 377-384
- Drysdale G.S., Fleet G.H. 1988. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 2: 143-154
- Du Toit W.J., Pretorius I.S., Lonvaud-Funel A. 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 4: 862-871
- Dugelay I., Gunata Z., Sapis J.-C., Baumes R., Bayonove C., De P. 1993. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 2092-2096
- Edlin D.A.N., Narbad A., Dickinson J.R., Lloyd D. 1995. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiology Letters*, 125, 2-3: 311-315
- Edlin D.A.N., Narbad A., Gasson M.J., Dickinson J.R., Lloyd D. 1998. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 4: 232-239
- Egli C.M., Henick-Kling T. 2001. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphism in the rRNA Internal transcribed spacer region. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 3: 241-247
- Erasmus D.J., Merwe G.K.V.D., Vuuren H.J.J.V. 2003. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, 3: 375-399
- Eraso P., Gancedo C. 1987. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Letters*, 224, 1: 187-192
- Fariña L., Medina K., Urruty M., Boido E., Dellacassa E., Carrau F. 2012. Redox effect on volatile compound formation in wine during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 134, 2: 933-939
- Fleet G.H. 1992. The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 1-25
- Fleet G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 1-2: 11-22
- Fugelsang K.C., Zoecklein B.W. 2003. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 4: 294-300
- Ganga M.A., Salinas F., Ravanal C., Garcia V., Carrasco C., Martinez C., Saavedra J. 2011. Cinnamic acid, ethanol and temperature interaction on coumarate decarboxylase activity and the relative expression of the putative cd gene in *D. bruxellensis*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14, 5: doi: 10.2225/vol14-issue5-fulltext-2: 8 str.

- Garcia A., Carcel C., Dulau L., Samson A., Aguera E., Agosin E., Günata Z. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles of a muscat wine. *Journal of Food Science*, 67, 3: 1138-1143
- Genovese C.R., Lazar N.A., Nichols T. 2002. Thresholding of statistical maps in functional neuroimaging using the false discovery rate. *Neuroimage*, 15, 4: 870-878
- Geny L., Darrieumerlou A., Donèche B. 2003. Conjugated polyamines and hydroxycinnamic acids in grape berries during *Botrytis cinerea* disease development: differences between 'noble rot' and 'grey mould'. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9, 2: 102-106
- Gerbaux V., Jeudy S., Monamy C. 2000. Study of phenol volatiles in Pinot noir wines in Burgundy. *Bulletin de l'OIV*, 73: 235-251
- Gerós H., Cássio F., Leao C. 1999. Transport of glucose in the wine spoilage yeast *Dekkera anomala*. *Food Technology and Biotechnology*, 37, 4: 213-224
- Godoy L., Martinez C., Carrasco N., Ganga M.A. 2008. Purification and characterization of a *p*-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 1-2: 6-11
- Godoy L., Garrido D., Martínez C., Saavedra J., Combina M., Ganga M.A. 2009. Study of the coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activities of *Dekkera bruxellensis* (anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) isolates. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 4: 452-457
- Goldberg D.M., Tsang E., Karumanchiri A., Soleas G.J. 1998. Quercetin and *p*-coumaric acid concentrations in commercial wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 2: 142-151
- Goodey A.R., Tubb R.S. 1982. Genetic and biochemical analysis of the ability of *Saccharomyces cerevisiae* to decarboxylate cinnamic acids. *Journal of General Microbiology*, 128, 11: 2615-2620
- Grandori R., Carey J. 1994. Six new candidate members of the  $\alpha/\beta$  twisted open-sheet family detected by sequence similarity to flavodoxin. *Protein Science*, 3, 12: 2185-2193
- Grbin P.R., Henschke P.A. 2000. Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6, 3: 255-262
- Guilloux-Benatier M., Chassagne D., Alexandre H., Charpentier C., Feuillat M. 2001. Influence de l'avtolysé des levures après fermentation sur le développement de *Brettanomyces/Dekkera* dans le vin. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 35: 157-164
- Guilloux-Benatier M.I., Chassagne D. 2003. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3: 746-751
- Gustin M.C., Albertyn J., Alexander M., Davenport K. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 4: 1264-1300
- Hammond J., Brennan M., Price A. 1999. The control of microbial spoilage of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 105, 2: 113-120

- Harris V., Ford C.M., Jiranek V., Grbin P.R. 2008. *Dekkera* and *Brettanomyces* growth and utilisation of hydroxycinnamic acids in synthetic media. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 6: 997-1006
- Harris V., Ford C., Jiranek V., Grbin P. 2009. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 6: 1117-1127
- Hashidoko Y., Tanaka T., Tahara S. 2001. Induction of 4-hydroxycinnamate decarboxylase in *Klebsiella oxytoca* cells exposed to substrates and non-substrate 4-hydroxycinnamate analogs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 12: 2604-2612
- Hazelwood L.A., Daran J.-M., van Maris A.J.A., Pronk J.T., Dickinson J.R. 2008. The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 8: 2259-2266
- Henick-Kling T., Edinger W., Daniel P., Monk P. 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 5: 865-876
- Heresztyn T. 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 2: 127-132
- Hernandez-Orte P., Bely M., Cacho J., Ferreira V. 2006. Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 2: 150-160
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 9: 1026-1030
- Huang Z., Dostal L., Rosazza J.P. 1994. Purification and characterization of a ferulic acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 176, 19: 5912-5918
- Jensen S.L., Umiker N.L., Arneborg N., Edwards C.G. 2009. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa*, and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. *Food Microbiology*, 26, 8: 915-921
- Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. 2006. The role and use of *non-Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27, 1: 15-39
- Karababa M., Coste A.T., Rognon B., Bille J., Sanglard D. 2004. Comparison of gene expression profiles of *Candida albicans* azole-resistant clinical isolates and laboratory strains exposed to drugs inducing multidrug transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 8: 3064-3079
- Kim D.-H., Hong Y.-A., Park H.-D. 2008. Co-fermentation of grape must by *Issatchenka orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnology Letters*, 30, 9: 1633-1638
- Koch A.L. 1981. Growth measurements V: Manual of methods for general bacteriology. Gerhardt P., Murray R.G.E., Costilow R.N., Nester E.W., Wood W.A., Kreig N.R., Phillips G.B. (eds.). Washington, D.C., American Society for Microbiology: 197-209

- Kurita O. 2008. Increase of acetate ester-hydrolysing esterase activity in mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia anomala*. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 4: 1051-1058
- Lai L.-C., Kosorukoff A.L., Burke P.V., Kwast K.E. 2006. Metabolic-state-dependent remodeling of the transcriptome in response to anoxia and subsequent reoxygenation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 5, 9: 1468-1489
- Lambrechts M.G., Pretorius I.S. 2000. Yeast and its importance to wine aroma: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21: 97–129
- Larue F., Rozes N., Froudiere F., Couty C., Perreira G.P. 1991. Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les moûts et les vins. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 25: 149–165
- Leão C., Van Uden N. 1985. Effects of ethanol and other alkanols on the temperature relations of glucose transport and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22, 5: 359-363
- Leite F.C.B., Basso T.O., Pita W.D.B., Gombert A.K., Simões D.A., Morais M.A. 2012. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Research*, 13, 1: 34-43
- Licker J.L., Acree T.E., Henick-Kling T. 1999. What is “Brett” (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation V: Chemistry of wine flavour. Waterhouse A.L., Ebeler S.E. (eds.). Washington D.C., American Chemical Society: 96–115
- Lilly M., Bauer F.F., Styger G., Lambrechts M.G., Pretorius I.S. 2006. The effect of increased branched chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Research*, 6, 5: 726-743
- Liu J., Zhang X., Zhou S., Tao P. 2007. Purification and characterization of a 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Chlamydophila pneumoniae* AR39. *Current Microbiology*, 54, 2: 102-107
- Lopes C.A., Jofre V., Sangorrin M.P. 2009. Spoilage yeasts in Patagonian winemaking: molecular and physiological features of *Pichia guilliermondii* indigenous isolates. *Revista Argentina de Microbiología*, 41: 177-184
- Loureiro V., Malfeito-Ferreira M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 23-50
- Luo Z., van Vuuren H.J.J. 2009. Functional analyses of *PAU* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 155, 12: 4036-4049
- Mansfield A.K., Zoecklein B.W., Whiton R.S. 2002. Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 4: 303-307
- Marks V.D., Sui S.J.H., Erasmus D., Merwe G.K.V.D., Brumm J., Wasserman W.W., Bryan J., Vuuren H.J.J.V. 2008. Dynamics of the yeast transcriptome during wine fermentation reveals a novel fermentation stress response. *FEMS Yeast Research*, 8: 35-52
- Martorell P., Malfeito-ferreira M., Ferna M.T., Loureiro V., Querol A. 2006. Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 79-84
- Medawar W., Strehaino P., Délia M.-L. 2003. Yeast growth: lag phase modelling in alcoholic media. *Food Microbiology*, 20, 5: 527-532

- Medina K., Boido E., Dellacassa E., Carrau F. 2005. Yeast interactions with anthocyanins during red wine fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, 56, 2: 104-109
- Millet V., Lonvaud-Funel A. 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Letters in Applied Microbiology, 30, 2: 136-141
- Morata A., Gómez-Cordovés M.C., Suberviola J., Bartolomé B., Colomo B., Suárez J.A. 2003. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 14: 4084-4088
- Morata A., Gómez-Cordovés M.C., Colomo B., Suárez J.A. 2005. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv *Graciano* grapes. European Food Research and Technology, 220, 3-4: 341-346
- Moreira N., Mendes F., Guedes de Pinho P., Hogg T., Vasconcelos I. 2008. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. International Journal of Food Microbiology, 124, 3: 231-238
- Morel-Salmi C.C., Souquet J.-M., Bes M., Cheynier V.R. 2006. Effect of flash release treatment on phenolic extraction and wine composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 12: 4270-4276
- Morrissey W.F., Davenport B., Querol A., Dobson A.D.W. 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. Journal of Applied Microbiology, 97, 3: 647-655
- Mroczeck S., Kufel J. 2008. Apoptotic signals induce specific degradation of ribosomal RNA in yeast. Nucleic Acids Research, 36, 9: 2874-2888
- Mukai N., Masaki K., Fujii T., Kawamukai M., Iefuji H. 2009. *PAD1* and *FDC1* are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 109, 6: 564-569
- Nardi T., Remize F., Alexandre H. 2010. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress genes expression. Applied Microbiology and Biotechnology, 88, 4: 925-937
- Oelofse A., du Toit M., Pretorius I.S. 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: A synoptic review. South African Journal of Enology and Viticulture, 29, 2: 128-144
- Oelofse A., Lonvaud-Funel A., du Toit M. 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. Food Microbiology, 26, 4: 377-385
- Pardo M., Ward M., Bains S., Molina M., Blackstock W., Gil C., Nombela C. 2000. A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. Electrophoresis, 21, 16: 3396-3410
- Paule M.R., White R.J. 2000. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acids Research, 28: 1283-1298
- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research, 30, 9: e36, doi: 10.1093/nar/30.9.e36: 10 str.
- Piškur J., Ling Z., Marcet-Houben M., Ishchuk O.P., Aerts A., LaButti K., Copeland A., Lindquist E., Barry K., Compagno C., Bisson L., Grigoriev I.V., Gabaldón T.,

- Phister T. 2012. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. International Journal of Food Microbiology, 157, 2: 202-209
- Pollnitz A.P., Pardon K.H., Sefton M.A. 2000. Quantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine. Journal of Chromatography A, 874: 101-109
- Pretorius I.S., Van der Westhuizen T.J., Augustyn O.P.H. 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. South African Journal of Enology and Viticulture, 20: 125-141
- Rachidi N., Martinez M.-J., Barre P., Blondin B. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* PAU genes are induced by anaerobiosis. Molecular Microbiology, 35, 6: 1421-1430
- Rangarajan E.S., Li Y., Iannuzzi P., Tocilj A., Hung L.-W., Matte A., Cygler M. 2004. Crystal structure of a dodecameric FMN-dependent UbiX-like decarboxylase (Pad1) from *Escherichia coli* O157: H7. Protein Science, 13, 11: 3006-3016
- Raspor P., Smole Možina S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, BIA d.d: 148 str.
- Rauhut D. 2009. Usage and formation of sulphur compounds V: Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. König H., Gottfried U., Fröhlich J. (eds.). Berlin, Springer: 181-207
- Regenberg B., During-Olsen L., Kielland-Brandt M.C., Holmberg S. 1999. Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics, 36, 6: 317-328
- Renouf V., Falcou M., Miot-Sertier C., Perello M.C., De Revel G., Lonvaud-Funel A. 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. Journal of Applied Microbiology, 100, 6: 1208-1219
- Renouf V., Lonvaud-Funel A. 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. Microbiological Research, 162, 2: 154-167
- Renouf V., Miot-sertier C., Revel G.D. 2009. Evidence for differences between *B. bruxellensis* strains originating from an enological environment. Journal of Wine Research: 95-100
- Rentzsch M., Schwarz M., Winterhalter P., Hermosín-Gutiérrez I. 2007. Formation of hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: precursor levels and evolution during aging. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 12: 4883-4888
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. 2006. Handbook of enology. The microbiology of wine and vinification. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester, John Wiley and Sons: 512 str.
- Rizzo M., Ventrice D., Varone M.A., Sidari R., Caridi A. 2006. HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 42, 1: 46-55
- Rodrigues N., Gonçalves G., Pereira-da-Silva S., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2001. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. Journal of Applied Microbiology, 90, 4: 588-599
- Rodriguez H., de las Rivas B., Munoz R., Mancheno J.M. 2007. Overexpression, purification, crystallization and preliminary structural studies of *p*-coumaric acid

- decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *Acta Crystallographica*, 63, 4: 300-303
- Romano A., Perello M.C., Revel G.D., Lonvaud-Funel A. 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 6: 1577-1585
- Rosenfeld E., Beauvoit B., Blondin B., Salmon J.-M. 2003. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under enological conditions: Effect on fermentation kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1: 113-121
- Rossouw D., Toit M.D., Bauer F.F. 2011. The impact of co-inoculation with *Oenococcus oeni* on the transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae* and on the flavour-active metabolite profiles during fermentation in synthetic must. *Food Microbiology*, 29, 1: 121-131
- Rozen S., Skaletsky H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers V: Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Krawetz S., Misener S. (eds.). Totowa, Humana Press: 365-386
- Saerens S.M.G., Delvaux F., Verstrepen K.J., Van Dijck P., Thevelein J.M., Delvaux F.R. 2008. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2: 454-461
- Saerens S.M.G., Delvaux F.R., Verstrepen K.J., Thevelein J.M. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 3, 2: 165-177
- Sáez J.S., Lopes C.A., Kirs V.C., Sangorrín M.P. 2010. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 2: 170-176
- Salameh D., Brandam C.d., Medawar W., Lteif R., Strehaino P. 2008. Highlight on the problems generated by *p*-coumaric acid analysis in wine fermentations. *Food Chemistry*, 107, 4: 1661-1667
- Sangorrín M., Lopes C., Jofre V., Querol A., Caballero A. 2008. Spoilage yeasts from Patagonian cellars: characterization and potential biocontrol based on killer interactions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 7: 945-953
- Scheffers W.A., Wiken T.O. 1969. The "Custer effect" (Negative Pasteur Effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 35: 31-32
- Shamir R., Maron-Katz A., Tanay A., Linhart C., Steinfeld I., Sharan R., Shiloh Y., Elkon R. 2005. EXPANDER - an integrative program suite for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*, 6: 232, doi:10.1186/1471-2105-6-232: 12 str.
- Shinohara T., Kubodera S., Yanagida F. 2000. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 1: 90-97
- Silva G.A.D., Poletto C.M., Poli J.S., Valente P. 2011. Influence of *Brettanomyces custersianus* upon the activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the tumultuous phase of vinification. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54: 347-356
- Silva P., Cardoso H., Geros H. 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 1: 65-72

- Silva S., Ramón-Portugal F., Andrade P., Abreu S., Texeira M.d.F., Strehaino P. 2003. Malic acid consumption by dry immobilized cells of *Schizosaccharomyces pombe*. American Journal of Enology and Viticulture, 54, 1: 50-55
- Simon R., Lam A., Li M.C., Ngan M., Menenzes S., Zhao Y. 2007. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. Cancer Informatics, 3: 11-17
- Smit A.l., Cordero Otero R.R., Lambrechts M.G., Pretorius I.S., Van Rensburg P. 2003. Enhancing volatile phenol concentrations in wine by expressing various phenolic acid decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 17: 4909-4915
- Snow P.G., Gallander J.F. 1979. Deacidification of white table wines through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. American Journal of Enology and Viticulture, 30, 1: 45-48
- Snowdon E.M., Bowyer M.C., Grbin P.R., Bowyer P.K. 2006. Mousy offflavour: A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 18: 6465-6474
- Soden A., Francis I.L., Oakey H., Henschke P.A. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Research, 6, 1: 21-30
- Sousa M.J., Miranda L., Corte-Real M., Leão C. 1996. Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments. Applied and Environmental Microbiology, 62, 9: 3152-3157
- Stead D. 1995. The effect of hydroxycinnamic acids and potassium sorbate on the growth of 11 strains of spoilage yeasts. Journal of Applied Microbiology, 78, 1: 82-87
- Stratford M., Plumridge A., Archer D.B. 2007. Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associated with the *PAD1* gene. Applied and Environmental Microbiology, 73, 20: 6534-6542
- Suárez R., Suárez-Lepe J.A., Morata A., Calderón F. 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. Food Chemistry, 102, 1: 10-21
- Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A., Pretorius I.S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11, 2: 139-173
- Tchobanov I., Gal L., Guilloux-Benatier M., Remize F., Nardi T., Guzzo J., Serpaggi V., Alexandre H. 2008. Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. FEMS Microbiology Letters, 284, 2: 213-217
- Toro M.E., Vazquez F. 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 4: 351-358
- Tusher V.G., Tibshirani R., Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 9: 5116-5121
- Ueno R., Urano N., Kimura S. 2001. Characterization of thermotolerant, fermentative yeasts from hot spring drainage. Fisheries Science, 67, 1: 138-145
- Ugliano M., Henschke P.A. 2009. Yeasts and wine flavour V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds.). Urrbrae, Adelaide, Springer Science+Business Media: 313-392

- Uscanga M.G.A., Delia M.-L., Strehaino P. 2000. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and physiology in batch and chemostat cultures. Canadian Journal of Microbiology, 46, 11: 1046-1050
- Uscanga M.G.A., Delia M.L., Strehaino P. 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. Applied Microbiology and Biotechnology, 61, 2: 157-162
- Valasek M.A., Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. Advances in Physiology Education, 29, 3: 151-159
- van Beek S., Priest F.G. 2000. Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 66, 12: 5322-5328
- van der Walt J.P. 1964. *Dekkera*, a new genus of the *Saccharomycetaceae*. Antonie van Leeuwenhoek, 30, 1: 273-280
- Van Urk H., Postma E., Scheffers W.A., Van Dijken J.P. 1989. Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. Journal of General Microbiology, 135, 9: 2399-2406
- Van Wyk C.J., Rogers I.M. 2000. A “phenolic” off-odour in white table wines: Causes and methods to diminish its occurrence. South African Journal of Enology and Viticulture, 21: 52-57
- Vigentini I., Romano A., Compagno C., Merico A., Molinari F., Tirelli A., Foschino R., Volonterio G. 2008. Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. FEMS Yeast Research, 8, 7: 1087-1096
- Wibowo D., Eschenbruch R., Davis C.R., Fleet G.H., Lee T.H. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. American Journal of Enology and Viticulture, 36, 4: 302-313
- Wilhelm J., Pingoud A. 2003. Real time polymerase chain reaction. Chembiochem, 4, 11: 1120-1128
- Woolfit M., Rozpedowska E., Piskur J., Wolfe K.H. 2007. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. Eukaryotic Cell, 6, 4: 721-733
- Zago A., Degrassi G., Bruschi C.V. 1995. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus pumilus* gene for ferulic acid decarboxylase. Applied and Environmental Microbiology, 61, 12: 4484-4486

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Rasporju in doc. dr. Neži Čadež, da sta me sprejela v raziskovalno ekipo in me vodila skozi raziskovalno delo. Hvaležen sem jima za vso njuno pomoč pri načrtovanju in pripravi poskusov, pri pisanju strokovnih znanstvenih člankov, doktorske naloge in laboratorijskih protokolov.

Predsedniku komisije prof. dr. Davidu Stoparju in članici komisije prof. dr. Ani Plemenitaš se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri pripravi Doktorske disertacije in pri določitvi raziskovalnih hipotez ter pri pregledovanju in popravljanju doktorskega dela.

Za finančno podporo se zahvaljujem Ministrstvu za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo Republike Slovenije (št. 1000-09-310217).

Zahvaljujem se g. Mateju Šerganu in dr. Juretu Zupanu za njuno izčrpno pomoč v laboratoriju in za vse njune nasvete.

Zahvaljujem se ga Dragici Markovič za pomoč pri reševanju logističnih težav in večno razumevanje in prijaznost.

Zahvaljujem se prof. dr. Dorit Schuller za vodenje in za vso pomoč, ki sem jo bil deležen na Portugalskem.

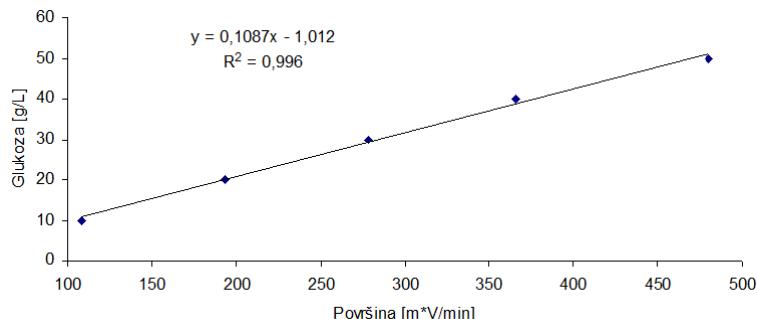
Zahvaljujem se Martini Avbelj in Lini Burkan za pomoč pri laboratorijskem delu in za pomoč pri pisanju doktorskega dela.

Zahvaljujem se Teji Zakrajšek, Katji Bezek in Luku Kranjcu za pomoč pri delu v laboratoriju in za vse nasvete, za pivo in za družbo. Zahvaljujem se Saši Piskernik za pomoč pri metodi PCR-RČ.

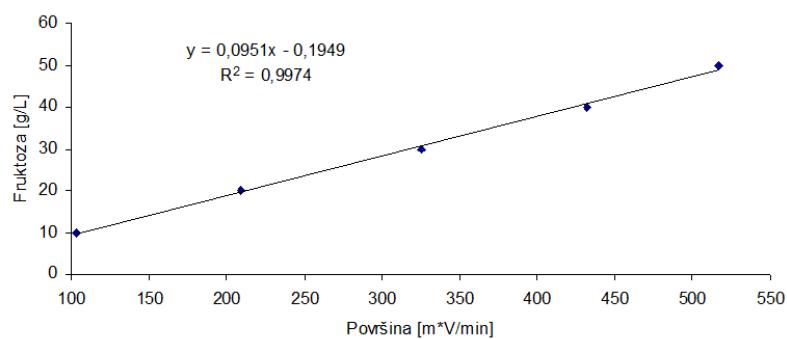
Zahvaljujem se vsem zaposlenim na katedri za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, za vse lepe trenutke in nasvete.

Zahvaljujem se staršem za podporo!

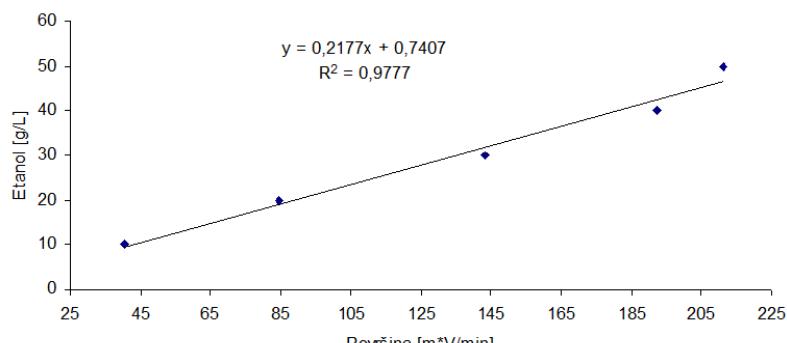
## PRILOGE



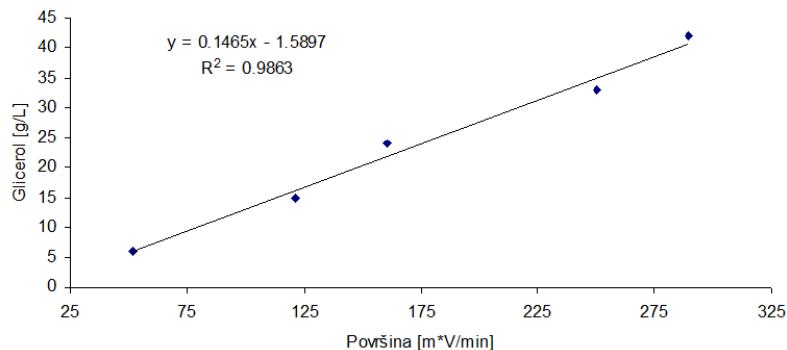
Priloga A1: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije glukoze. Vrednosti v g/L so bile pridobljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



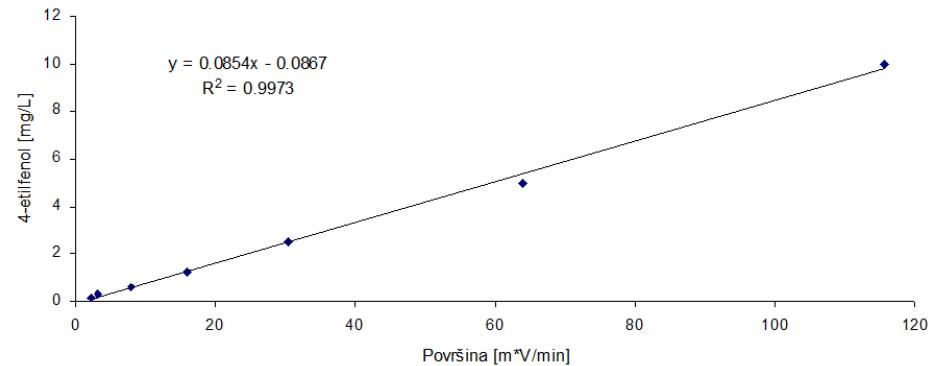
Priloga A2: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije fruktoze. Vrednosti v g/L so bile pridobljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



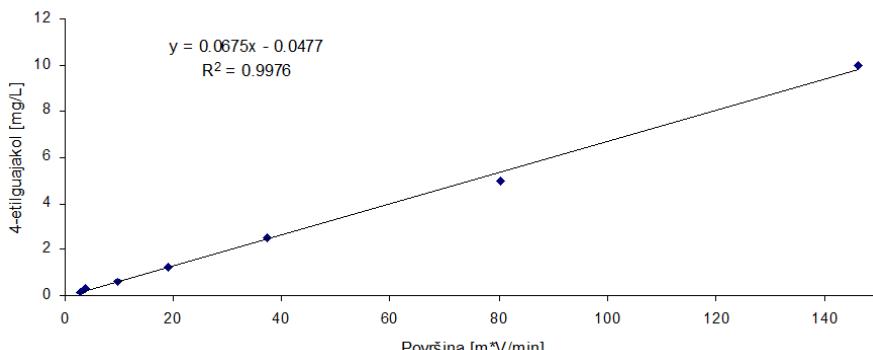
Priloga A3: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije etanola. Vrednosti v g/L so bile pridobljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



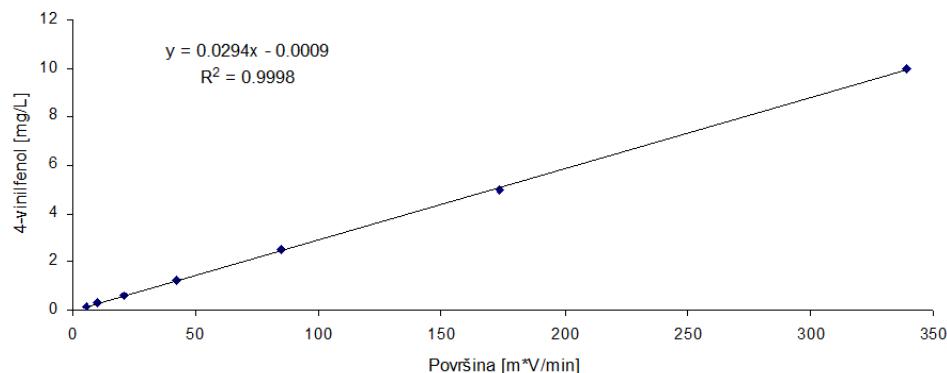
Priloga A4: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije glicerola. Vrednosti v g/L so bile pridobljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



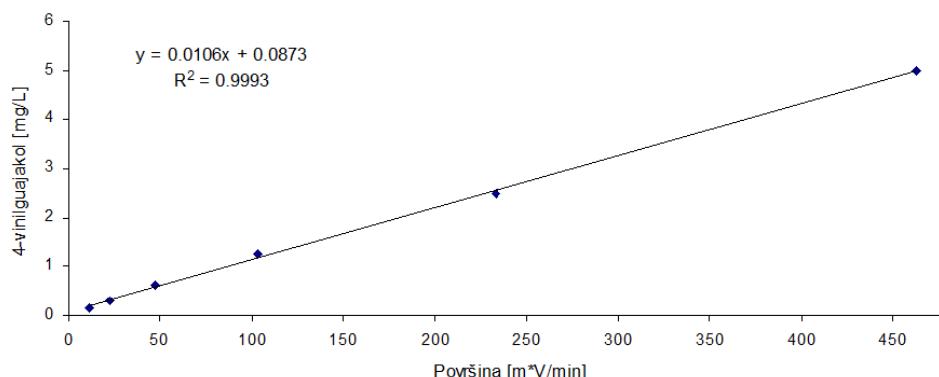
Priloga A5: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 4-etylfenola. Vrednosti v mg/L so bile pridobljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



Priloga A6: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 4-etylguajakola. Vrednosti v mg/L so bile pridobljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



Priloga A7: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 4-vinilfenola. Vrednosti v mg/L so bile pridobljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



Priloga A8: Umeritvena krivulja za določitev koncentracije 4-vinilguajakola. Vrednosti v mg/L so bile pridobljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

Priloga B1: Kopiranje hlapnih estrov, višjih alkoholov, maščobnih kislin in organskih kislin po 22 urah fermentacije z umetnim moštom MS300, ki smo ga inokulirali z membransko ločeno ali čisto kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Vse vrednosti so izražene v mg/L ± standardna deviacija. Metaboliti katerih koncentracija je pod mejo detekcije, so označeni z "nd".

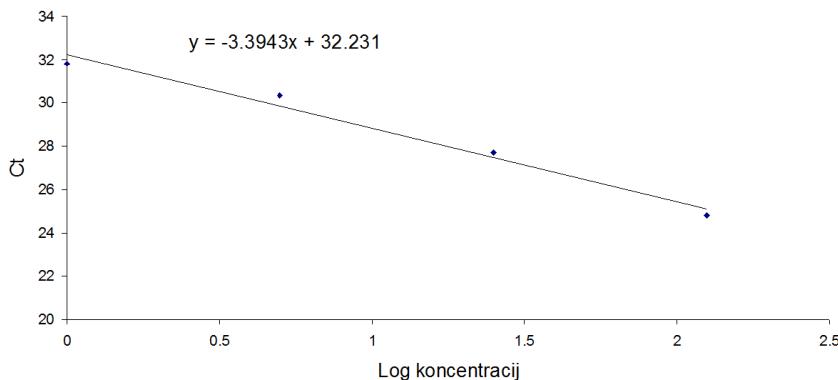
22 ur			
[mg/L]	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. bruxellensis</i>	Membransko ločena kultura
Etil-izobutirat	nd	nd	nd
Etilpropionat	nd	nd	nd
Etilbutirat	nd	nd	nd
Etil-izovalerat	nd	nd	nd
Etilcinamat	0,0024 ± 0,0002	0,0010 ± 0,0002	0,0012 ± 0,0001
Etil-fenil-acetat	nd	nd	nd
Etil-laktat	0,231 ± 0,092	0,055 ± 0,004	0,274 ± 0,012
Dietilsucinat	nd	nd	nd
Etilheksanoat	nd	nd	0,015 ± 0,007
Etil-2-metil-butirat	nd	nd	nd
Etilvalerat	nd	nd	nd
Etiloktanoat	0,0031 ± 0,0005	nd	0,004 ± 0,0004
Etildecanoat	0,0004 ± 0,0002	nd	0,0009 ± 0,0003
Etildodecanoat	nd	nd	0,0005 ± 0,0003
Etilheptanoat	nd	nd	nd
Propilacetat	0,0008 ± 0,0011	nd	0,0014 ± 0,0006
Butilacetat	0,0006 ± 0,0008	nd	0,0012 ± 0,0003
Izoamil-acetat	0,026 ± 0,007	nd	0,035 ± 0,006
2-fenil-ethyl-acetat	0,043 ± 0,002	nd	0,051 ± 0,002
Izobutil-acetat	nd	nd	nd
Heksanol	0,016 ± 0,001	0,016 ± 0,004	0,012 ± 0,001
2-metil-1-butanol	0,78 ± 0,18	0,013 ± 0,007	0,79 ± 0,09
Izoamil-alkohol	6,19 ± 0,26	nd	7,01 ± 2,22
2-feniletanol	4,88 ± 0,92	0,066 ± 0,006	4,74 ± 0,36
Izobutanol	2,28 ± 0,38	0,024 ± 0,005	1,959 ± 0,799
Izovalerna kislina	0,073 ± 0,001	0,024 ± 0,004	0,095 ± 0,013
Heksanojska kislina	0,417 ± 0,099	0,015 ± 0,002	0,573 ± 0,018
Oktanojska kislina	0,293 ± 0,047	0,028 ± 0,005	0,512 ± 0,017
Dekanojska kislina	0,152 ± 0,006	0,132 ± 0,003	0,205 ± 0,004
Dodekanojska kislina	nd	nd	0,055 ± 0,001

Priloga B2: Kopiranje hlapnih estrov, višjih alkoholov, maščobnih kislin in organskih kislin po 92 urah fermentacije z umetnim moštom MS300, ki smo ga inokulirali z membransko ločeno ali čisto kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Vse vrednosti so izražene v mg/L ± standardna deviacija. Metaboliti katerih koncentracija je pod mejo detekcije, so označeni z "nd".

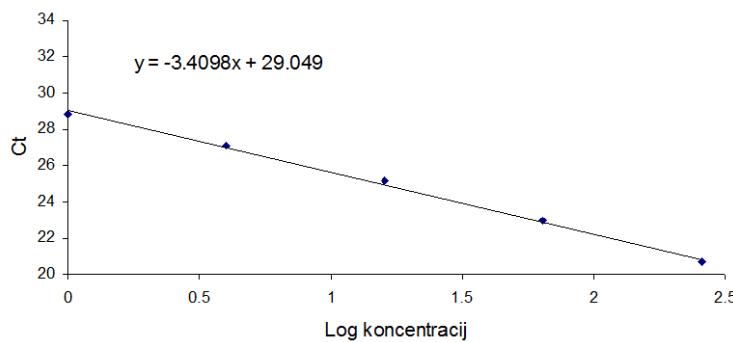
92 ur			
[mg/L]	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. bruxellensis</i>	Membransko ločena kultura
Etil-izobutirat	0,020 ± 0,005	nd	0,033 ± 0,003
Etilpropionat	0,062 ± 0,001	nd	0,081 ± 0,002
Etilbutirat	0,076 ± 0,002	nd	0,096 ± 0,008
Etil-izovalerat	0,0026 ± 0,0001	nd	0,0058 ± 0,0002
Etilcinamat	0,0051 ± 0,0001	0,0016 ± 0,0003	0,0040 ± 0,0001
Etil-fenil-acetat	0,0013 ± 0,0002	nd	0,0030 ± 0,0001
Etil-laktat	6,62 ± 0,82	0,075 ± 0,003	6,16 ± 0,11
Dietilsucinat	0,0090 ± 0,0012	nd	0,025 ± 0,005
Etilheksanoat	0,159 ± 0,007	nd	0,155 ± 0,014
Etil-2-metil-butirat	nd	nd	0,002 ± 0,0003
Etilvalerat	0,0008 ± 0,0001	nd	0,0012 ± 0,0002
Etiloktanoat	0,1279 ± 0,0128	nd	0,0879 ± 0,0017
Etildekanoat	0,0495 ± 0,0010	0,00052 ± 0,00001	0,0317 ± 0,0091
Etildodekanoat	0,0187 ± 0,0098	nd	0,0116 ± 0,0032
Etilheptanoat	0,0015 ± 0,0001	nd	0,0014 ± 0,0001
Propilacetat	0,0236 ± 0,0060	nd	0,0238 ± 0,0024
Butilacetat	0,0029 ± 0,0003	nd	0,0038 ± 0,0001
Izoamil-acetat	0,965 ± 0,030	nd	1,128 ± 0,096
2-fenil-etyl-acetat	0,264 ± 0,003	nd	0,213 ± 0,017
Izobutil-acetat	0,105 ± 0,002	nd	0,082 ± 0,006
Heksanol	0,017 ± 0,002	0,019 ± 0,001	0,018 ± 0,001
2-metil-1-butanol	8,72 ± 0,27	0,021 ± 0,001	6,99 ± 0,11
Izoamil-alkohol	231,2 ± 6,9	0,25 ± 0,03	241,3 ± 16,9
2-feniletanol	29,02 ± 2,31	0,147 ± 0,005	26,16 ± 4,94
Izobutanol	45,23 ± 3,49	0,030 ± 0,001	33,186 ± 3,159
Izovalerna kislina	0,420 ± 0,011	0,155 ± 0,005	0,570 ± 0,082
Heksanojska kislina	1,98 ± 0,12	0,068 ± 0,004	2,09 ± 0,11
Oktanojska kislina	1,141 ± 0,018	0,072 ± 0,001	0,994 ± 0,001
Dekanojska kislina	0,710 ± 0,038	0,137 ± 0,001	0,507 ± 0,007
Dodekanojska kislina	0,340 ± 0,003	nd	0,272 ± 0,001

Priloga B3: Kopičenje hlapnih estrov, višjih alkoholov, maščobnih kislin in organskih kislin po 144 urah fermentacije z umetnim moštom MS300, ki smo ga inokulirali z membransko ločeno ali čisto kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Vse vrednosti so izražene v mg/L ± standardna deviacija. Metaboliti katerih koncentracija je pod mejo detekcije, so označeni z "nd".

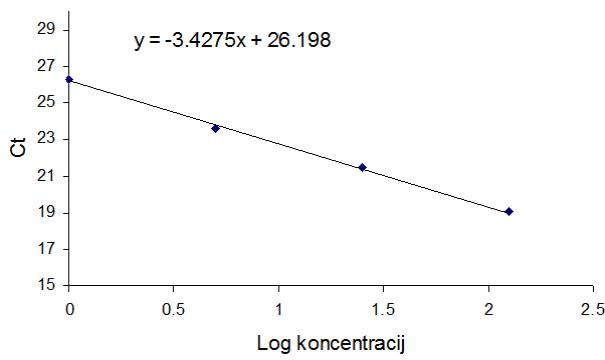
[mg/L]	<i>S. cerevisiae</i>	<i>D. bruxellensis</i>	Membransko ločena kultura
	<b>144 ur</b>		
Etil-izobutirat	0,024 ± 0,004	nd	0,062 ± 0,006
Etilpropionat	0,082 ± 0,001	nd	0,089 ± 0,001
Etilbutirat	0,093 ± 0,006	nd	0,117 ± 0,005
Etil-izovalerat	0,0040 ± 0,0007	nd	0,0128 ± 0,0002
Etilcinamat	0,0039 ± 0,0007	0,0025 ± 0,0001	0,0090 ± 0,0004
Etil-fenil-acetat	0,0012 ± 0,0002	nd	0,0078 ± 0,0004
Etil-laktat	8,06 ± 0,54	0,104 ± 0,013	8,69 ± 0,35
Dietilsucinat	0,021 ± 0,001	nd	0,053 ± 0,003
Etilheksanoat	0,157 ± 0,002	nd	0,151 ± 0,002
Etil-2-metil-butirat	nd	nd	0,0035 ± 0,0004
Etilvalerat	0,0015 ± 0,0001	nd	0,0018 ± 0,0003
Etiloktanoat	0,0469 ± 0,0257	0,0047 ± 0,0003	0,0808 ± 0,0196
Etildekanoot	0,0045 ± 0,0005	0,00202 ± 0,0009	0,0411 ± 0,0023
Etildodekanoot	0,005nd,0001	nd	0,0075 ± 0,0045
Etilheptanoat	0,0011 ± 0,0003	nd	0,0017 ± 0,0002
Propilacetat	0,0236 ± 0,0002	nd	0,0207 ± 0,0006
Butilacetat	0,0029 ± 0,0002	nd	0,0030 ± 0,0006
Izoamil-acetat	1,063 ± 0,039	nd	1,155 ± 0,080
2-fenil-etyl-acetat	0,199 ± 0,014	nd	0,217 ± 0,019
Izobutil-acetat	0,115 ± 0,001	nd	0,074 ± 0,009
Heksanol	0,020 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,022 ± 0,002
2-metil-1-butanol	10,25 ± 0,36	0,041 ± 0,008	10,07 ± 0,26
Izoamil-alkohol	344,4 ± 13,6	0,59 ± 0,20	314,3 ± 13,9
2-feniletanol	32,29 ± 2,05	0,325 ± 0,076	38,58 ± 2,78
Izobutanol	55,97 ± 0,21	0,056 ± 0,009	40,944 ± 2,394
Izovalerna kislina	0,447 ± 0,044	0,360 ± 0,016	1,07 ± 0,03
Heksanojska kislina	1,61 ± 0,11	0,346 ± 0,023	2,29 ± 0,10
Oktanojska kislina	0,672 ± 0,016	0,243 ± 0,042	0,873 ± 0,015
Dekanojska kislina	0,348 ± 0,013	0,153 ± 0,009	0,416 ± 0,001
Dodekanoska kislina	0,150 ± 0,005	nd	0,152 ± 0,008



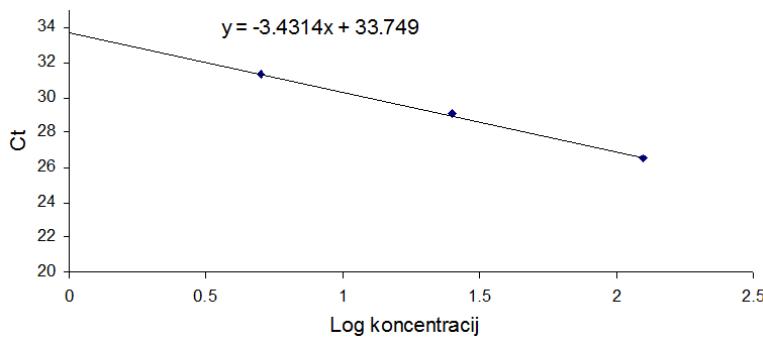
Priloga C1: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *PADI* kvasovke *S. cerevisiae*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,3943) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 97,1 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



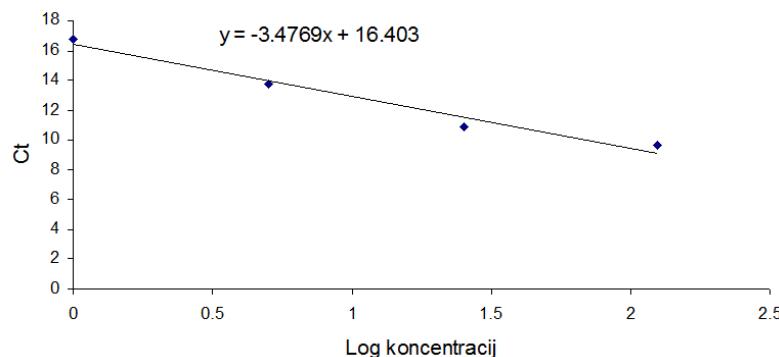
Priloga C2: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *TEF1* kvasovke *S. cerevisiae*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,4098) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 96,8 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



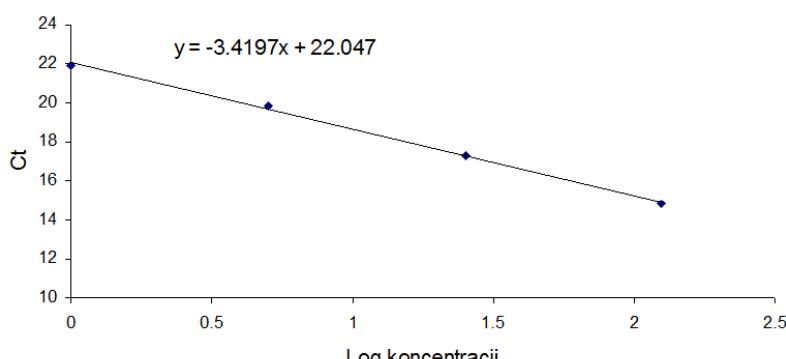
Priloga C3: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *ACT1* kvasovke *S. cerevisiae*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,4275) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 95,8 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



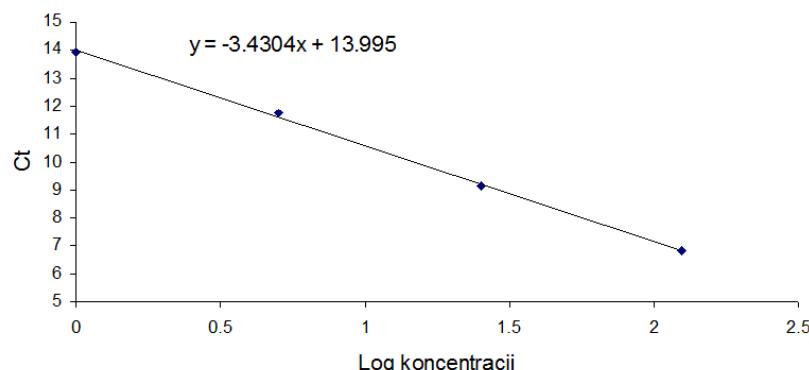
Priloga C4: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *FDC1* kvasovke *S. cerevisiae*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,4314) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 95,6 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



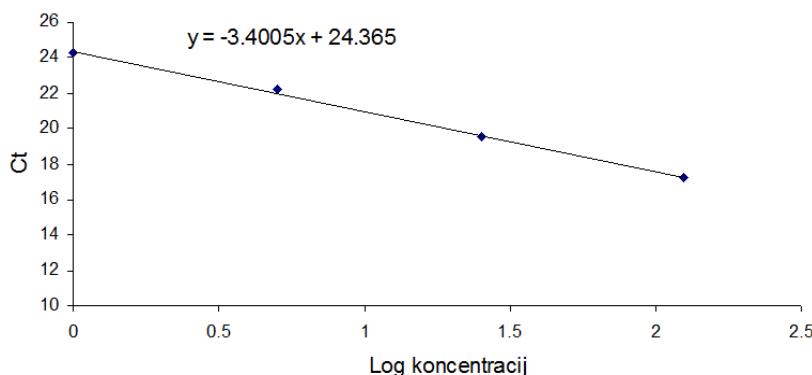
Priloga C5: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *18S rRNA* kvasovke *S. cerevisiae*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,4769) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 93,9 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



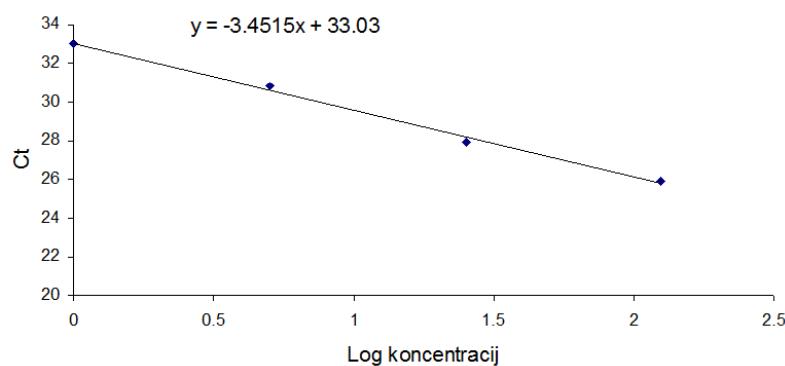
Priloga C6: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *TEF1* kvasovke *D. bruxellensis*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,4197) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 96,1 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



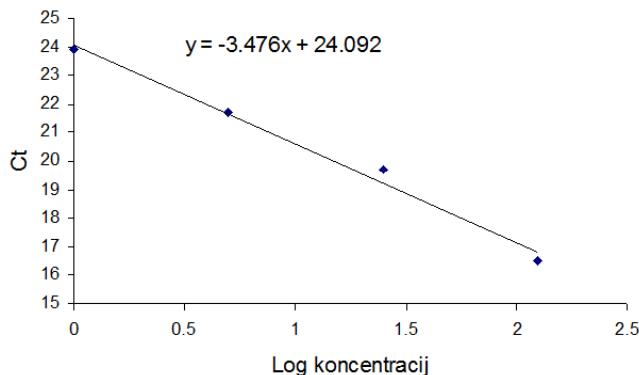
Priloga C7: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *18S rRNA* kvasovke *D. bruxellensis*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,4304) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 95,7 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



Priloga C8: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *VPR* kvasovke *D. bruxellensis*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,4005) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 96,8 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



Priloga C9: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *KKD* kvasovke *D. bruxellensis*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,4515) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 94,9 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.



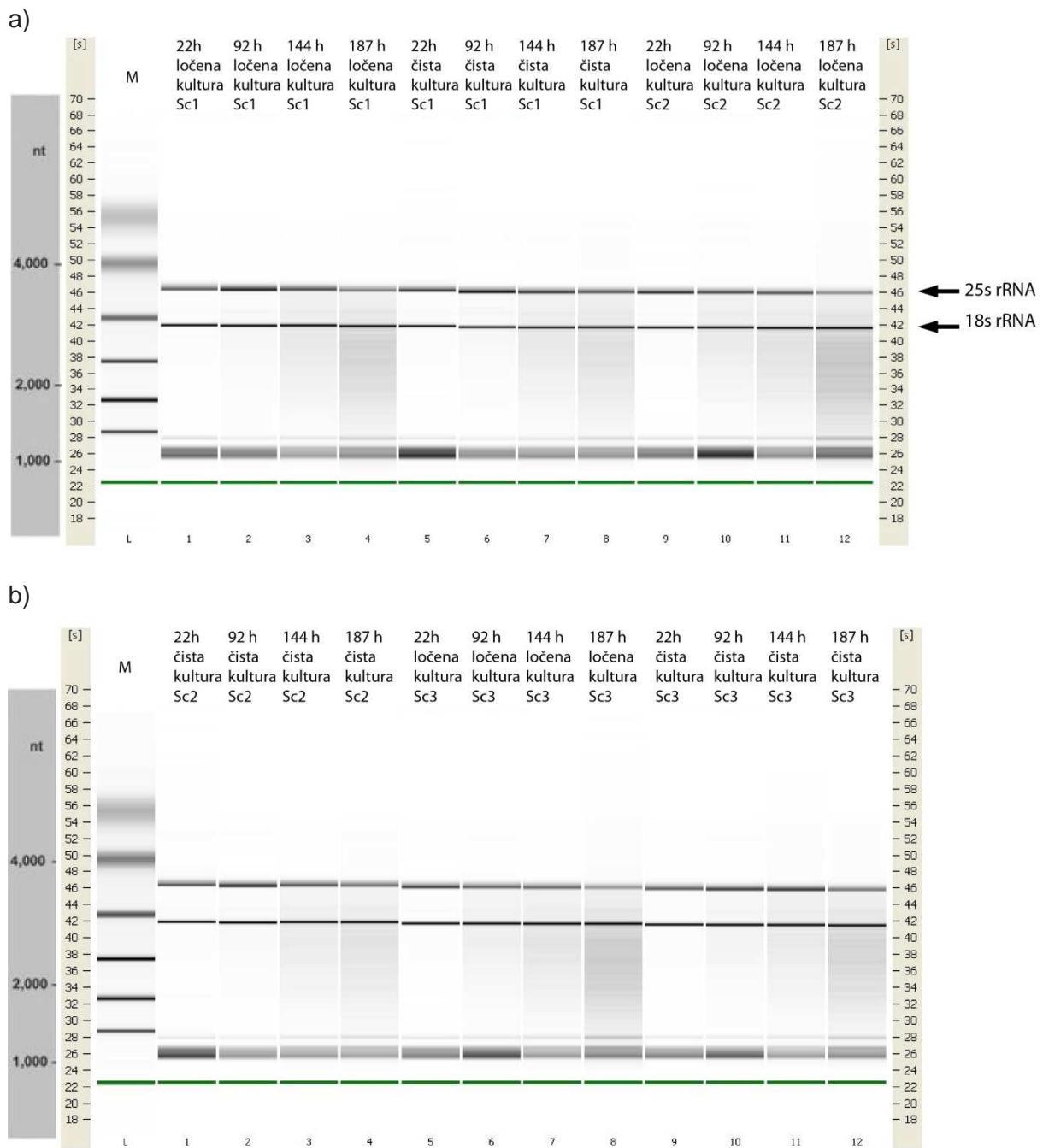
Priloga C10: Umeritvena krivulja logaritmiranih vrednosti koncentracije RNA (5x redčitvena vrsta) za gen *ACT1* kvasovke *D. bruxellensis*. Na ordinati so predstavljene vrednosti  $c_t$ , na abscisi pa logaritmirane vrednosti koncentracij RNA. Glede na naklon krivulje (-3,476) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja, ki je znašala 93,9 %. Prikazane so povprečne vrednosti treh ponovitev.

Priloga D: Razporeditev 77 pozitivno izraženih transkriptov kvasovke *S. cerevisiae* glede na njihovo stopnjo izraženosti v membransko ločeni fermentaciji s kvasovko *D. bruxellensis* proti čisti kulturi kvasovke *S. cerevisiae*.

ORF	Ime gena	Biološki proces	Izražanje
YGR122W		Katabolizem jedrne mRNA	2,003387
YGL074C		Nepoznan	2,019631
YHR146W	<i>CRP1</i>	Nepoznan	2,026755
YPR092W		Nepoznan	2,030897
YOR146W		Nepoznan	2,059946
YDR374C		Nepoznan	2,063768
YLR458W		Nepoznan	2,067228
YMR252C		Nepoznan	2,079616
YDR218C	<i>SPR28</i>	Tvorba askospor	2,09704
YOL101C	<i>IZH4</i>	Metabolizem lipidov	2,121856
YGL184C	<i>STR3</i>	Biosinteza Metionina	2,126879
YGR055W	<i>MUP1</i>	Transport žveplo-vsebujočih aminokislin	2,155996
YKR053C	<i>YSR3</i>	Biosinteza sfingolipidov	2,165481
YBR209W		Nepoznan	2,179878
YDR024W	<i>FYV1</i>	Nepoznan	2,18501
YLR445W	<i>GMC2</i>	Mejoza	2,192583
YML066C	<i>SMA2</i>	Ukrivljanje membrane spor	2,244313
YLR225C		Nepoznan	2,250571
YJR038C		Nepoznan	2,252378
YLR162W		Nepoznan	2,259015
YGL261C	<i>PAU11</i>	Nepoznan	2,283375
YDL210W	<i>UGA4</i>	Transport gama-aminobutirata	2,292107
YPR002C-A		Nepoznan	2,296816
YNR042W		Nepoznan	2,333238
YDR492W	<i>IZH1</i>	Metabolizem lipidov	2,342605
YJL152W		Nepoznan	2,378196
YJL150W		Nepoznan	2,37842
YPR136C		Nepoznan	2,39134
YFL032W		Nepoznan	2,396052
YFL012W-A		Nepoznan	2,42458
YMR107W	<i>SPG4</i>	Nepoznan	2,427474
YLR282C		Nepoznan	2,441506
YDL221W		Nepoznan	2,443261
YGR088W	<i>CTT1</i>	Odziv na reaktivne kisikove radikale	2,453696
YGR294W	<i>PAU12</i>	Nepoznan	2,462803
YOL014W		Nepoznan	2,522767
YBL031W	<i>SHE1</i>	Podaljšanje mitotskega vlakna	2,536567
YDR488C	<i>PAC11</i>	Microtubularni proces	2,587218
YJL050W	<i>MTR4</i>	Procesiranje primarnih transkriptov 35S	2,616482
YLR031W		Nepoznan	2,641941
YLR366W		Nepoznan	2,643163
YGL188C		Nepoznan	2,736374
YDR360W	<i>OPI7</i>	Nepoznan	2,824081
YJL106W	<i>IME2</i>	Aktivacija mejoze	2,831961
YKL202W		Nepoznan	2,854607
YOL035C		Nepoznan	2,87409

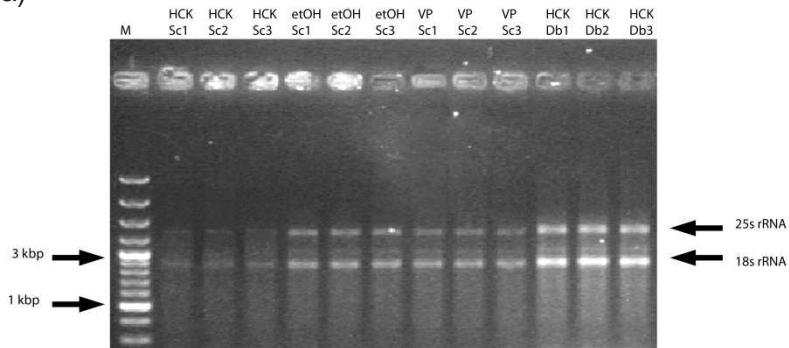
»Nadaljevanje priloge D: Razporeditev 77 pozitivno izraženih transkriptov kvasovke *S. cerevisiae* glede na njihovo stopnjo izraženosti v membransko ločeni fermentaciji s kvasovko *D. bruxellensis* proti čisti kulturi kvasovke *S. cerevisiae*.«

ORF	Ime gena	Biološki proces	Izražanje
YPL282C	<i>PAU22</i>	Nepoznan	2,883456984
YHL005C		Nepoznan	2,903033459
YOR394W	<i>PAU21</i>	Nepoznan	2,948233928
YGR139W		Nepoznan	2,956045242
YMR006C	<i>PLB2</i>	Metabolizem glicerofosfolipidov	3,022619756
YJL223C	<i>PAU1</i>	Nepoznan	3,033185014
YIR041W	<i>PAU15</i>	Nepoznan	3,034071323
YCR104W	<i>PAU3</i>	Nepoznan	3,105004803
YIL176C	<i>PAU14</i>	Nepoznan	3,107712406
YBR301W	<i>PAU24</i>	Nepoznan	3,111914667
YCL024W	<i>KCC4</i>	S septini nadzorovana kontrolna točka	3,1504622
YML047W-A		Nepoznan	3,312851304
YAL034C-B		Nepoznan	3,411025287
YJR120W		Transport sterolov	3,500562342
YFL019C		Nepoznan	3,527445639
YMR245W		Nepoznan	3,530501427
YPR121W	<i>THI22</i>	Biosinteza tiamina	3,561995021
YLR037C	<i>PAU23</i>	Nepoznan	3,568764
YGL015C		Nepoznan	3,573135439
YEL049W	<i>PAU2</i>	Nepoznan	3,624694737
YAR020C	<i>PAU7</i>	Nepoznan	3,948309954
YFL020C	<i>PAU5</i>	Nepoznan	4,26344457
YCL023C		Nepoznan	4,412818775
YHL045W		Nepoznan	4,50896809
YNL120C		Nepoznan	5,172033967
YLL025W	<i>PAU17</i>	Nepoznan	5,285465361
YPL073C		Nepoznan	5,614866806
YFL058W	<i>THI5</i>	Biosinteza tiamina	6,343616252
YNL332W	<i>THI12</i>	Biosinteza tiamina	6,436201528
YDL244W	<i>THI13</i>	Biosinteza tiamina	7,651520676
YJR156C	<i>THI11</i>	Biosinteza tiamina	7,871753259

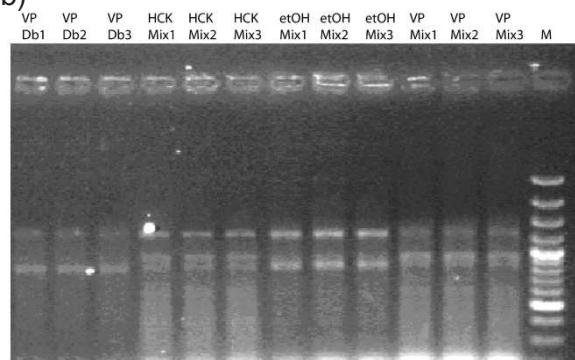


Priloga E: Elektroforezna analiza celokupne molekule RNA na gelu mikrofluidne aparature Agilent 2100 Bioanalyzer. Analiza kvalitete celokupne RNA izolirane iz čistih in membransko ločenih fermentacij kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* z mikrofluidno aparaturom Agilent 2100 Bioanalyzer. RNA smo izolirali izključno iz biomase, ki je bila pridobljena iz tiste strani membranskega bioreaktorja, ki je vseboval samo kvasovko *S. cerevisiae*. Vzorci RNA so bili izolirani po 22, 92, 144 in 187 urah fermentacije. Na slikah a) in b) so analizirani vsi uporabljeni vzorci (v treh ponovitvah), ki smo jih uporabili za transkriptomsko analizo na DNA mikromrežah. Na slikah a) in b) sta označeni 18S in 25S ribosomalni podenoti izolirane RNA.

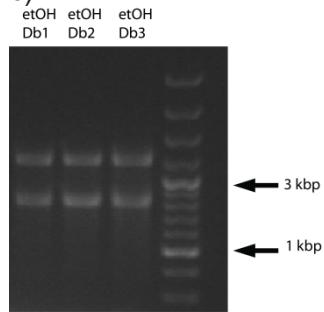
a)



b)

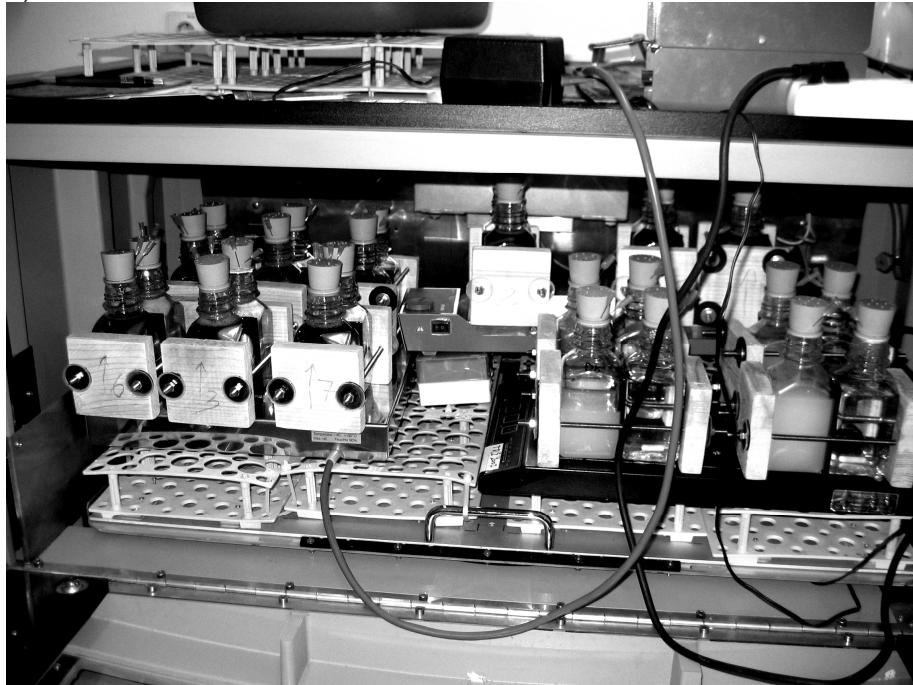


c)

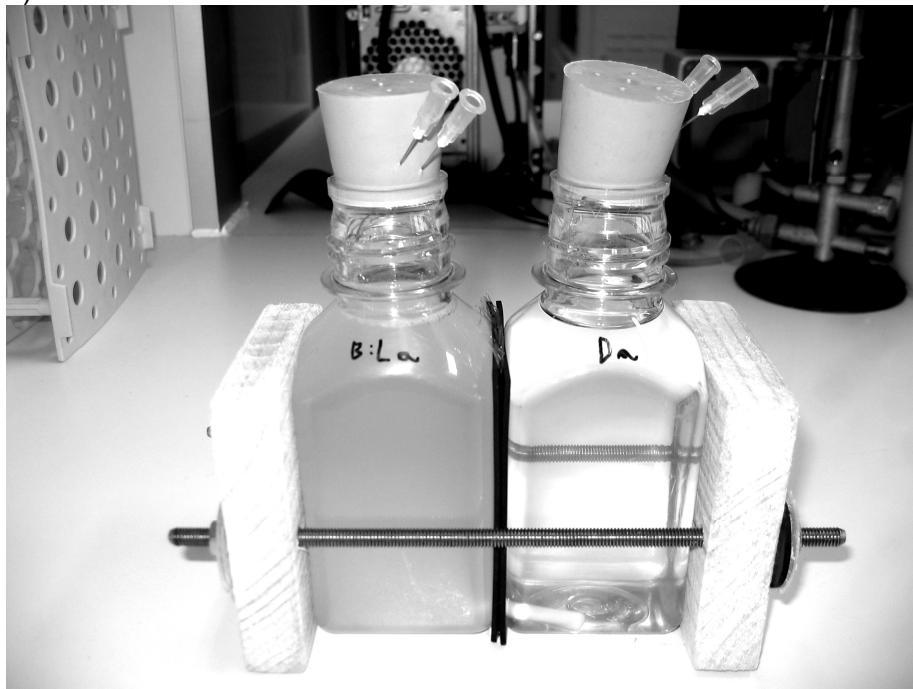


Priloga F: Agarozna gelska elektroforeza za analizo kvalitete celokupne molekule RNA. Z elektroforezo smo analizirali kvaliteto celokupne RNA izolirane iz čistih in mešanih fermentacij kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* z agarozno gelsko elektroforezo. RNA smo izolirali iz biomase mešanih fermentacij in iz biomase fermentacij s čisto kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis*. Vzorci RNA so bili izolirani po 50 urah fermentacije. Na slikah a), b) in c) so analizirani vsi uporabljeni vzorci (v treh ponovitvah), ki smo jih uporabili za analizo izražanja genov z metodo PCR-RČ. Na slikah a), b) in c) sta označeni 18S in 25S ribosomalni podenoti izolirane RNA. M: molekularni označevalec dolžin 100-10000 bp.

a)



b)



Priloga G: Fotografije fermentacij v membranskih bioreaktorjih sestavljenih iz dveh predelov. Slika a) prikazuje inkubacijo na magnetnih ploščah v stresalniku INFORS pri temperaturi 22 °C; slika b) pa fermentacijo v membranskem bioreaktoru tik pred vzorčenjem.