

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Neja JANČIČ

**DOLOČITEV GENETSKIH SPREMENOB OB
ZAPOREDNI UPORABI KVASOVKE *Saccharomyces*
pastorianus PRI PROIZVODNJI PIVA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Neja JANČIČ

**DOLOČITEV GENETSKIH SPREMENOB OB ZAPOREDNI UPORABI
KVASOVKE *Saccharomyces pastorianus* PRI PROIZVODNJI PIVA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

**GENETIC MODIFICATIONS IN YEAST *Saccharomyces pastorianus*
DURING SERIAL REPITCHING IN BEER PRODUCTION**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 28. 11. 2014 sprejela temo in za mentorico imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za somentorico doc. dr. Nežo Čadež in za recenzenta doc. dr. Tomaža Accetta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Somentorica: doc. dr. Neža Čadež
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzent: doc. dr. Tomaž Accetto
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga 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.

Neja Jančič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 602.3:582.282.23:577.2:579.253.4 (043.2)
KG *Saccharomyces pastorianus*/kvasovke/pivo/genetske spremembe/zaporedna uporaba/mikrosateliti/kariotip/izrašanje genov
AV JANČIČ Neja
SA SMOLE MOŽINA Sonja (mentorica), ČADEŽ Neža (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2016
IN DOLOČITEV GENETSKIH SPREMEMB OB ZAPOREDNI UPORABI KVASOVKE *Saccharomyces pastorianus* PRI PROIZVODNJI PIVA
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XII, 70, [5] str., 24 pregl., 33 sl., 1 pril., 52 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Proces proizvodnje piva vključuje ponovno uporabo starterske kulture kvasovk *Saccharomyces pastorianus*, kar lahko privede do kopiranja genetskih sprememb v celicah. Namen našega dela je bil ugotoviti genetske spremembe v številu ponovitev mikrosatelitskih zaporedij in v dolžinah kromosomov kvasovk, kot tudi spremembe v izrašanju gena za maltozno permeazo. Kvasno biomaso smo vzorčili v eksponentni fazи rasti tekom fermentacije, in sicer v 1. in 4., ter nato od 12. do 15. ciklu zaporedne uporabe. Za določanje števila ponovitev znotraj mikrosatelitov smo izolirali DNA kvasovk neposredno iz pivine ter pomnožke PCR ločili z agarozno in kapilarno elektroforezo. Mikrosatelitska zaporedja smo poiskali v bližini tehnoško pomembnih genov. Za spremljanje dolžinskih polimorfizmov kromosomov smo uporabljali metodi izolacije intaktnih kromosomov kvasne biomase ter elektroforezo v pulzirajočem polju. Za spremljanje izrašanja genov transporterjev za maltozo smo uporabljali metode izolacije RNA iz kvasne biomase, sintezo cDNA ter kvantitativni PCR. Izmed 34 testiranih mikrosatelitov smo spremembe tekom zaporedne uporabe kvasovk zaznali pri 5 mikrosatelitih. Večina se nahaja v bližini genov, odgovornih za transport maltoze, maltotrioze in sulfita v celico. Sprememb v dolžini kromosomov nam ni uspelo dokazati, čeprav publikacije kažejo, da se le-te dogajajo. S kvantitativnim PCR smo pokazali, da se izrašanje gena za maltozno permeazo tekom zaporedne fermentacije spreminja. Sklepamo lahko, da zmanjšano izrašanje gena za maltozno permeazo in spremembe v številu ponovitev mikrosatelitskih zaporedij v bližini tega gena negativno vplivajo na transport maltoze in maltotrioze. Neporabljeni sladkorja lahko imata negativen vpliv na končne organoleptične lastnosti piva.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ŠD Du2
DK UDC 602.3:582.282.23:577.2:579.253.4 (043.2)
KG *Saccharomyces pastorianus*/yeast/beer/genetic modification/serial repitching/
microsatellite/karyotype/gene expresion
AV JANČIČ Neja
SA SMOLE MOŽINA Sonja (supervisor), ČADEŽ Neža (co-advisor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
LI 2016
IN GENETIC MODIFICATIONS IN YEAST *Saccharomyces pastorianus* DURING
SERIAL REPITCHING IN BEER PRODUCTION
TD M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
OP XII, 70, [5] p., 24 tab., 33 fig., 1 ann., 52 ref.
IJ sl
JI sl/en
AI Yeast repitching is used in beer production and may result in genetic modifications
of yeast cells. We sampled yeast biomass in exponential phase of industrial
production (1., 4., 12., 13., 14. and 15. serial repitching). We showed modifications
in three different ways; on microsatellite, chromosome and gene expression level.
For microsatellite monitoring we used DNA isolation from wort, PCR and
detection of PCR products with gel electrophoresis and capillary electrophoresis.
We have been searching for microsatellites, which are close to technologically
important genes. Chromosome changes have been monitored with DNA isolation in
gel and pulsed-field gel electrophoresis. For gene expression determination we used
RNA isolation, cDNA synthesis and quantitative PCR. We tested 34 microsatellites
and in 5 of them we observed modifications during serial repitching. Most of them
were found close to genes, which are responsible for maltose, maltotriose and
sulphide transport into the cell. We were not able to confirm chromosome
changes. With quantitative PCR we demonstrated that gene expression of maltose
permease differs between consecutive uses. We concluded that down regulated genes
and modifications in number of repeats in microsatellites have negative impact on
maltose and maltotriose transport into the cell. Unfermented maltose and maltotriose
could affect final organoleptic characteristics of beer.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KVASOVKA <i>Saccharomyces pastorianus</i>	2
2.2 PROIZVODNJA PIVA	6
2.3 PORABA SLADKORJEV MED FERMENTACIJO	8
2.4 PRODUKCIJA SULFITA	11
2.5 ZAPOREDNA UPORABA IN STARANJE KVASOVK	12
2.5.1 Flokulacija in sedimentacija	13
2.5.2 Shranjevanje kvasne biomase pred ponovno uporabo	14
2.5.3 Genetske spremembe	14
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 POTEK DELA	19
3.2 MATERIALI	20
3.2.1 Vzorci	20

3.2.2	Mikrobiološka gojišča	20
3.2.3	Laboratorijski material	20
3.2.4	Laboratorijska oprema	21
3.2.5	Kemikalije in pufri	21
3.2.6	Računalniški programi, baze podatkov in spletne strani	23
3.3	METODE	24
3.3.1	Analiza mikrosatelitov	24
3.3.2	Elektroforetska kariotipizacija	32
3.3.3	Izražanje genov	34
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	38
4.1	MIKROSATELITI	38
4.1.1	Izbira mikrosatelitov in začetnih oligonukleotidov	38
4.1.2	Primerjalna analiza prve in štirinajste zaporedne uporabe	39
4.1.3	Primerjalna analiza vseh zaporednih uporab	45
4.1.4	Primerjalna analiza treh zaporednih uporab na DNA posameznih kolonij	47
4.1.5	Ustreznost izbora mikrosatelitov	51
4.2	ELEKTROFORETSKA KARIOTIPIZACIJA	52
4.3	IZRAŽANJE GENOV	55
5	SKLEPI	62
6	POVZETEK	63
7	VIRI	66
ZAHVALA		
PRILOGA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Izpostavljenost stresu med uporabo kvasovk (Jenkins in sod., 2003)	13
Preglednica 2: Koncentracija celic v vzorcih	20
Preglednica 3: Tehnološko pomembni geni	25
Preglednica 4: Seznam mikrosatelitov, ki se nanašajo na kvasovko <i>S. pastorianus</i> Weihenstephan 34/70 (ABPO00000000)	26
Preglednica 5: Sestava mešanice za metodo verižne reakcije s polimerazo s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi	27
Preglednica 6: Program za metodo verižne reakcije s polimerazo s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi	27
Preglednica 7: Sestava mešanice za cenovno ugodnejšo reakcijo PCR	29
Preglednica 8: Program za cenovno ugodnejšo reakcijo PCR	29
Preglednica 9: Sestava mešanice za metodo verižne reakcije s polimerazo z izboljšano eksonukleazno aktivnostjo	29
Preglednica 10: Sestava mešanice za cenovno ugodnejšo reakcijo PCR s polimerazo z izboljšano eksonukleazno aktivnostjo	30
Preglednica 11: Oblika podajanja rezultatov s programom BioNumerics (A1 - mikrosatelit TA ₁₁ pri fermentaciji A, N1 - mikrosatelit TA ₁₁ pri fermentaciji N, številka 9 (levo zgoraj) - število ponovitev motivov znotraj mikrosatelita, številka 5603 (levo spodaj) – višina vrha, številka 187.13 (desno zgoraj) – določena velikost, številka 188 (desno spodaj) – pričakovana velikost glede na sekvenco mikrosatelita)	31
Preglednica 12: Pogoji ločevanja pri pulzni gelski elektroforezi	33
Preglednica 13: Seznam začetnih oligonukleotidov in hibridizacijskih sond za qPCR	34
Preglednica 14: Protokol za sintezo cDNA	35
Preglednica 15: Sestava mešanice za qPCR	36
Preglednica 16: Program za qPCR	36
Preglednica 17: Identiteta genov	38
Preglednica 18: Natančne dolžine pomnožkov PCR in število ponovitev znotraj mikrosatelita	43

Preglednica 19: Natančne dolžine pomnožkov PCR in število ponovitev znotraj mikrosatelita pri analizi posameznih kolonij.....	48
Preglednica 20: Vrednosti Cq tarčnega in referenčnega gena združenega vzorca vseh zaporednih uporab (vrednosti izločene iz analize so označene s sivo barvo)	55
Preglednica 21: Učinkovitost pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena	56
Preglednica 22: Vrednosti Cq tarčnega in referenčnega gena zaporednih uporab (vrednosti izločene iz analize so označene s sivo barvo).....	57
Preglednica 23: Relativno izražanje gena za maltozno permeazo z metodo delta-delta Cq	59
Preglednica 24: Relativno izražanje gena za maltozno permeazo z metodo s pomočjo umeritvenih krivulj	60

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Saccharomyces pastorianus</i> (DiArc ... , 2015)	2
Slika 2: Askomicetna gliva iz rodu <i>Cyttaria</i> (<i>Cyttaria</i> , 2015)	3
Slika 3: Tri nahajališča <i>S. eubayanus</i> in države začetka pivovarstva spodnjega vrenja v Evropi	3
Slika 4: Struktura kromosomov lager kvasovke <i>S. pastorianus</i> (Wendland, 2014).....	5
Slika 5: Potek proizvodnje piva v Pivovarni Laško (Kako nastane pivo, 2015).....	6
Slika 6: Strukturni formuli maltoze in maltotrioze (Steinbüchel, 2010)	8
Slika 7: Poraba sladkorjev v pivini (Vidgren, 2010)	9
Slika 8: Transport sladkorjev v celico (Vidgren, 2010)	10
Slika 9: Lokus MAL na kromosому II (SGD, 2015).....	10
Slika 10: Pot sinteze sulfita	11
Slika 11: Prikaz novih hčerinskih celic (a) in starih materinskih celic (b) po šestih delitvah (Powell in sod., 2000).....	14
Slika 12: Zdrs polimeraze in povečano ali zmanjšano število ponovitev mikrosatelita (Štajner, 2010)	16
Slika 13: Shematska predstavitev kariotipov ob zaporedni uporabi <i>S. pastorianus</i> pri fermentaciji ječmena (11 zaporednih uporab) (Deželak in sod., 2014).....	17
Slika 14: Ekspresijski profil izražanja genov, povezanih z odzivom na stres, med zaporedno uporabo (Bühligen in sod., 2013)	18
Slika 15: Shema eksperimentalnega dela	19
Slika 16: Začetni oligonukleotidi pri cenovno ugodnejši reakciji PCR (Schuelke, 2000) ..	28
Slika 17: Potek pomnoževanja pri cenovno ugodnejši reakciji PCR (Schuelke, 2000).....	28
Slika 18: Slike gelov in elektroforegram dobljeni s programom BioNumerics (A1 - mikrosatелit TA ₁₁ pri fermentaciji A, N1 - mikrosatелit TA ₁₁ pri fermentaciji N, Kromatogram: A1 - rdeče, N1 - modro).....	31
Slika 19: Standard dolžin kromosomov vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bio-Rad)	33
Slika 20: Slika gela pomnoženih fragmentov s klasično reakcijo PCR (A-prva in N-štirinajsta zaporedna uporaba).....	39

Slika 21: Slika gela pomnoženih fragmentov s cenovno ugodnejšo reakcijo PCR (A-prva in N-štirinajsta zaporedna uporaba).....	39
Slika 22: Elektroforegrami mikrosatelitov prve (rdeča barva) in štirinajste (modra barva) zaporedne uporabe kvasovk.....	42
Slika 23: Pojavnost različnih fragmentov z različnim številom ponovitev pri zaporedni uporabi kvasa.....	45
Slika 24: »Stutter« profil pri mikrosatelitu (TAT) ₁₁	46
Slika 25: Posamezne kolonije prve zaporedne uporabe	47
Slika 26: Analiza mikrosatelita (TTA) ₇₇ pri posameznih kolonijah (vrstni red kolonij ne sovpada z vrstnim redom v preglednici 19).....	49
Slika 27: Analiza mikrosatelita (TCG) ₆ pri posameznih kolonijah (vrstni red kolonij ne sovpada z vrstnim redom v preglednici 19).....	50
Slika 28: Kariotipi ob prvi (A), četrти (D), dvanajsti (L), štirinajsti (N) in petnajsti (O) zaporedni uporabi kvasa (M-standard)	52
Slika 29: Umeritvena krivulja za tarčni gen, MAL31 var 2	56
Slika 30: Umeritvena krivulja za referenčni gen, TEF1	56
Slika 31: Relativno izražanje gena za maltozno permeazo z metodo delta-delta Cq	59
Slika 32: Relativno izražanje gena za maltozno premeazo z metodo s pomočjo umeritvenih krivulj	60
Slika 33: Metabolna aktivnost kvasovk ob zaporedni uporabi na različnih virih ogljika. Lestvica metabolne aktivnosti od največje (zelena) do najmanjše (rdeče) aktivnosti (neobjavljen vir)	61

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	odstotek
°C	stopinje Celzija
$2^{-\Delta C_q}$	metoda primerjalna metoda Cq
APS	adenilsulfat
ATP	adenozin trifosfat
bp	bazni par
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
CHEF	elektroforeza v homogenem sklenjenem električnem polju, angl. contour clamped homogeneous electric field
CPE(S)	citratni fosfatni pufer (sorbitol)
Cq	cikel kvantifikacije
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DEPC	dietilpirokarbonat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid
DTT	dithiotreitol
E	učinkovitost
EDTA	etilen diamin tetraocetna kislina
FAM	fluorescentno barvilo
FLO	flokulacijski (gen)
k	naklon krivulje
LMP	nizka točka taljenja, angl. low melting point
MAL	maltozni (lokus/gen)
MgCl ₂	magnezijev klorid
Na ₂ HPO	dinatrijev fosfat

NaOH	natrijev hidroksid
obr/min	obrati na minuto
PAPS	3`fosfoadenililsulfat
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RNA	ribonukleinska kislina
RQ	relativna kvantifikacija
SGD	<i>Saccharomyces</i> genomska baza, angl. <i>Saccharomyces</i> Genome Database
SSR	enostavna zaporedja, angl. simple sequence repeats
STRs	kratke tandemske ponovitve, angl. short tandem repeats
TAE	tris-acetat-EDTA
TBE	tris-borat-EDTA
Tef	transkripcijski elongacijski faktor
Tris/HCl	tris hidroksimetil amino metan/klorovodikova kislina
U	enota, angl. unit
VNTRs	spremenljivo število tandemskih ponovitev, angl. variable number of tandem repeats
WebSat	angl. A Web Software for MicroSatellite Marker Development

1 UVOD

Saccharomyces pastorianus je kvasovka spodnjega vrenja, za katero je značilna hibridna narava. Nastala naj bi z združitvijo genomov dveh vrst, *Saccharomyces cerevisiae* in nedavno opisano psihrofilno vrsto iz Patagonije, *Saccharomyces eubayanus*. Novo nastali hibrid je z združitvijo pridobil več genskih lokusov, ki nosijo pomembne tehnološke lastnosti v pivovarstvu, kot so sprejem maltoze in maltotrioze ter produkcija sulfita. Sprejem sladkorjev je postal mogoč pri nizkih temperaturah (8-15 °C), produkcija sulfita pa je zaradi antioksidativne aktivnosti pomembna za stabilnost okusa.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

V pivovarstvu se zaradi želje po znižanju stroškov poslužujejo zaporedne uporabe kvasovk, kar privede do genetskih sprememb. Genetske spremembe lahko vplivajo na učinkovitost fermentacije, tako da povzročajo spremembe v poteku fermentacije ali vplivajo na okus in aroma piva.

1.2 CILJI NALOGE

Cilj naloge je ugotoviti morebitne genetske spremembe pri kvasovki *S. pastorianus* ob zaporedni uporabi na več različnih načinov. Prvi način je ugotovitev števila ponovitev mikrosatelitskih zaporedij s kapilarno elektroforezo. Drugi način je preverjanje morebitnih dolžinskih polimorfizmov kromosomov z elektroforetsko kariotipizacijo. Tretji način je spremeljanje izraženje gena za transport maltoze in maltotrioze z metodo kvantitativnega PCR.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Na nivoju mikrosatelitov bo prišlo do sprememb v številu ponovitev mikrosatelitskih zaporedij.
- Na nivoju kromosomov bo prišlo do sprememb dolžin kromosomov zaradi insercij/delecijs med mitoznimi delitvami.
- Na nivoju izražanja genov bo prišlo do sprememb v izražanju transporterjev za maltozo in maltotreozo zaradi prilagoditve kvasovke na substrat.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KVASOVKA *Saccharomyces pastorianus*

Kvasovka *S. pastorianus* je medvrstni hibrid, ki se uporablja za proizvodnjo piv ležakov. Za ta piva je značilno, da fermentacija poteka pri nizkih temperaturah, kvasovke pa se po flokulaciji usedejo na dno konusnih tankov. Kvasovka *S. pastorianus* je najverjetneje nastala zaradi prilagoditve na tehnološke zahteve pivovarjev, saj je s hibridizacijo dveh genomov vrst *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces eubayanus* pridobila pomembne lastnosti za fermentacijo; možnost metabolizma pri nizkih temperaturah (8-15 °C), dobro izkoriščanje maltoze in maltotrioze ter produkcijo sulfita, ki služi za stabilnost okusa in kot antioksidant (Gibson in Liti, 2015).



Slika 1: *Saccharomyces pastorianus* (DiArc ... , 2015)

Za kvasovko spodnjega vrenja *S. pastorianus* je bilo sicer že dolgo znano, da je hibrid med kvasovko zgornjega vrenja *S. cerevisiae* in neznano, proti mrazu odporno kvasovko (Nakao in sod., 2009). Najprej so mislili, da je ta psihrofilna kvasovka *S. bayanus* (hibrid med *S. cerevisiae* in *S. uvarum*), nato pa so Libkind in sod. (2011) dokazali, da je allotetraploidna kvasovka *S. pastorianus* nastala s hibridizacijo med *S. cerevisiae* in *S. Eubayanus*. Hibridizaciji so sledile obsežne genomske reorganizacije, ki se kažejo v izgubi heterozigotnosti in rekombinantnih himernih kromosomih. Kdaj in v kakšnih okoliščinah je prišlo do hibridizacije, ne vemo. Predvideva se, da se je *S. eubayanus* v pivovarstvu pojavila kot okužba s selektivno prednostjo, to je z odpornostjo proti nizkim temperaturam. Hibrid je od obeh staršev pridobil kompetitivno prednost (heteroza) in tako je hitro prevladal v populaciji kvasovk med fermentacijo.

Prve kvasovke *S. eubayanus* so našli v južni Ameriki, natančneje v Patagoniji na jugu Argentine. Našli so jih na askomicetnih glivah iz rodu *Cyttaria*, ki se na drevesih iz rodu

Nothofagus nahajajo kot paraziti. Tvorjena plodišča vsebujejo veliko enostavnih sladkorjev in tako predstavljajo primeren habitat za kvasovke (Libkind in sod., 2011).



Slika 2: Askomicetna gliva iz rodu *Cyttaria* (*Cyttaria*, 2015)

Kasneje so jih izolirali tudi na območju Tibetanske planote na Kitajskem, zato Bing in sod. (2014) pravijo, da del genoma kvasovke lager, ki ne pripada *S. Cerevisiae*, izhaja in Aziji, in ne Amerike.



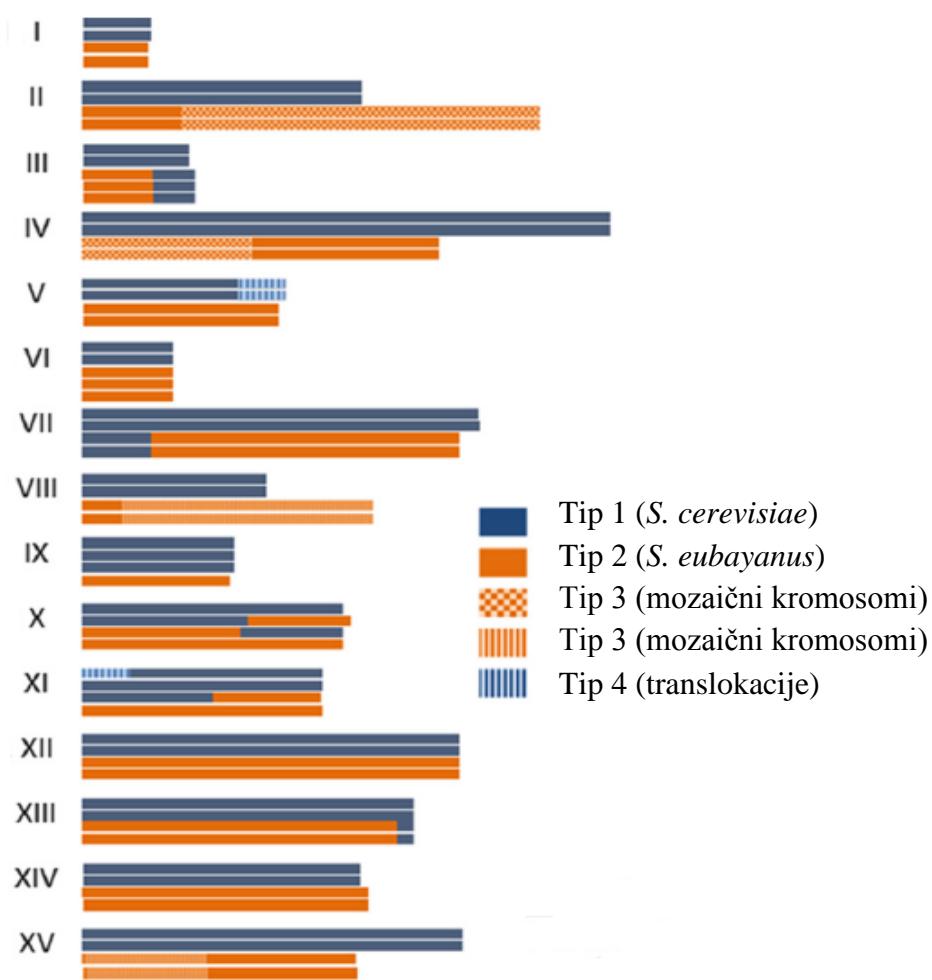
Slika 3: Tri nahajališča *S. eubayanus* in države začetka pivovarstva spodnjega vrenja v Evropi

Filogenetske analize so pokazale, da se azijska subpopulacija razlikuje od ameriške. Azijska populacija naj bi imela 99,82 % podobnost z delom genoma kvasovke lager, ki ne pripada *S. cerevisiae*, medtem ko naj bi imela ameriška populacija le 99,56 % podobnost. Azijska hipoteza je mnogo bolj verjetna od ameriške hipoteze, saj je več zgodovinskih trgovskih povezav (svilna cesta) potekalo med Azijo in Evropo, kot med Ameriko in Evropo. Prav tako se je pivovarstvo spodnjega vrenja na Bavarskem začelo že okoli leta 1400, medtem ko je Krištof Kolumb Ameriko odkril komaj leta 1492. Pred kratkim pa so Peris in sod. (2014) *S. eubayanus* izolirali tudi v ameriški zvezni državi Wisconsin, blizu mesta Milwaukee. Do sedaj *S. eubayanus* v Evropi še niso našli, verjetno zaradi izredno

specifičnega življenjskega prostora, ki ga nudijo askomicetne glive iz rodu *Cyteria* (Bing in sod., 2014).

Možno je, da je do hibridizacije in nastanka *S. pastorianus* prišlo večkrat, kar bi privedlo do raznolikosti pivovarskih sevov, vendar je njihova genetska raznolikost v primerjavi s *S. cerevisiae* nizka. Zaradi hibridne narave vrste *S. pastorianus* le-ta redko sporulira oz. nastale spore niso viabilne. Danes delimo *S. pastorianus* na dve liniji, to sta liniji Saaz in Frohberg. Linija Saaz izhaja iz Češke in danske pivovarne Carlsberg, linija Frohberg pa iz ostalih pivovarn na Danskem, Nizozemske in Nemčije. Čeprav obe liniji združujeta lastnosti rasti pri nizkih temperaturah in sedimentacije po flokulaciji, se vseeno malo razlikujeta. Za linijo Saaz je značilno, da zelo dobro flokulira, ampak slabo porablja sladkorje med fermentacijo. Za linijo Frohberg pa je značilno, da dobro porablja sladkorje med fermentacijo (še posebej maltotrizo), vendar pa se slabo poseda po koncu fermentacije (Gibson in Liti, 2015). Razlikujeta se tudi po produkciji izoamil acetata, ki vpliva na okus piva. Pivu daje sladek oz. saden okus. Linija Saaz producira veliko več te spojine kot linija Frohbert (Wendland, 2014). Te značilnosti so posledica različnega nastanka hibridov. Razlikujeta se tudi v ploidnosti (Saaz 2n in Frohberg 3n). Linija Saaz naj bi nastala z združitvijo haploidnih spor *S. cerevisiae* in *S. eubayanus*. Po združitvi je diploid izgubil velik del DNA *S. cerevisiae* in tako v končni fazi pridobil več DNA *S. eubayanus*. Linija Frohbert pa naj bi nastala s povezavo diploidne celice *S. cerevisiae* in haploidne celice *S. eubayanus* in tako pridobila več DNA *S. cerevisiae* (Gibson in Liti, 2015).

Sekvenciran sev *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 (linija Frohberg) vsebuje 36 kromosomov različnih tipov. Kromosomi so tipa 1 (*S. cerevisiae*), tipa 2 (*S. eubayanus*), tipa 3 (mozaični kromosomi *S. cerevisiae* in *S. pastorianus* posledica ene recipročne in sedmih nereciprocnih translokacij) in tipa 4 (translokacije znotraj transpozonov in ohranjenih genov na kromosomih V in XI *S. cerevisiae*) (Wendland, 2014).



Slika 4: Struktura kromosomov lager kvasovke *S. pastorianus* (Wendland, 2014)

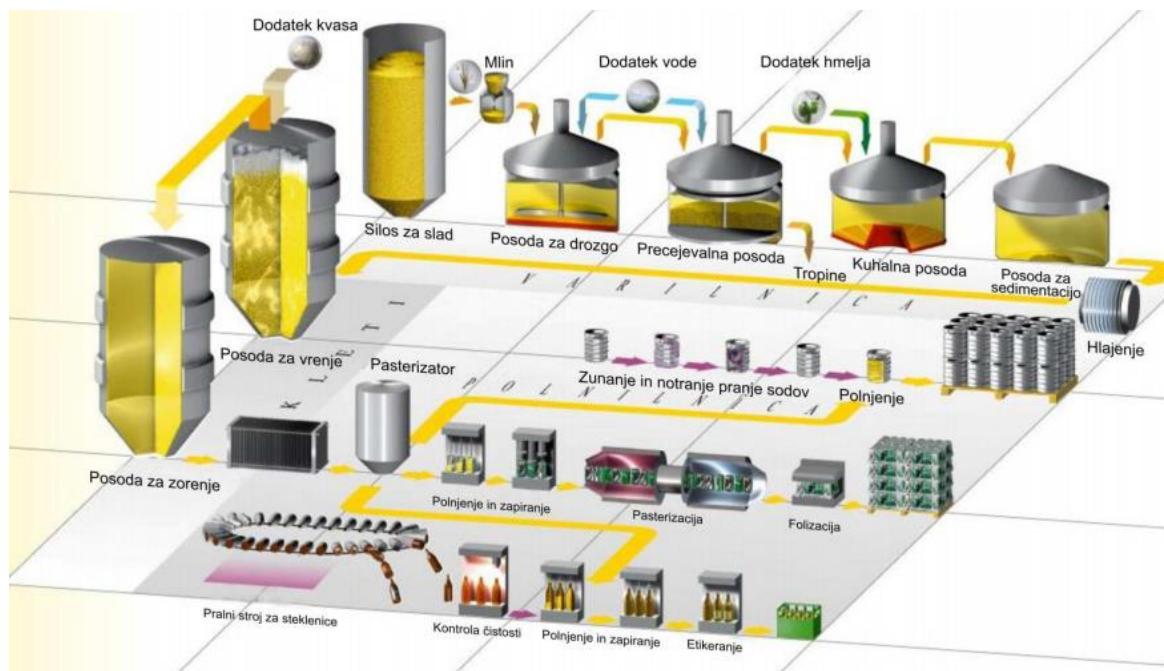
Translokacije so dokaz genomskeih preureditev, ki so se dogajale po nastanku hibrida. Domneva se, da so posledica ostrih pogojev med fermentacijo. (Wendland, 2014).

V večini primerov so v genomu *S. pastorianus* prisotni ortologni geni *S. cerevisiae* in *S. eubayanus*, vendar je po navadi eden od njiju nefunkcionalen zaradi pojava mutacij (premik bralnega okvirja ali pojav stop kodona pred koncem kodirajoče regije gena). Te mutacije se ponavadi nahajajo tudi v genih za transport sulfita, maltoze in maltotrioze. Primera takih genov sta gen MAL31 kvasovke *S. eubayanus* in AGT1 kvasovke *S. cerevisiae* (Nakao in sod., 2009). Mitohondrijska DNA kvasovke spodnjega vrenja je v celoti pridobljena iz genoma *S. eubayanus* (Wendland, 2014).

2.2 PROIZVODNJA PIVA

Proizvodnjo piva sestavlja več zaporednih stopenj:

- priprava sladu
- varjenje
- primarna fermentacija
- sekundarna fermentacija ali zorenje
- filtracija
- polnjenje



Slika 5: Potek proizvodnje piva v Pivovarni Laško (Kako nastane pivo, 2015)

Da se proizvodnja piva lahko začne, je potrebno imeti zagotovljene glavne sestavine. Osnovno surovinu pri proizvodnji piva predstavlja slad, ki ga pridobivajo s kaljenjem ječmena v sladarni. Druga pomembna sestavina je voda, ki predstavlja največji delež surovin piva. Ta mora biti mikrobiološko neoporečna in z nizko vsebnostjo karbonatov. Piva pa seveda ni brez hmelja, ki z grenkimi in aromatičnimi snovmi daje značilno prijetno aroma in osvežilno grenkobo. Kot zadnja sestavina pa so pomembne kvasovke, brez katerih ne bi prišlo do vrenja. V pivovarstvu ločimo dve skupini kvasovk. To so kvasovke spodnjega vrenja ali lager kvasovke (*S. pastorianus*) ter kvasovke zgornjega vrenja, ale kvasovke (*S. cerevisiae*). V primeru uporabe kvasovk spodnjega vrenja je temperatura fermentacije med 4 °C in 12 °C, pri fermentaciji s kvasovkami zgornjega vrenja pa je temperatura med 14 °C in 25 °C. Pri proizvodnji slada semena ječmena najprej očistijo, nato pa namočijo v vodi. Namakanju sledi kaljenje semen, kjer se aktivirajo citolitični encimi, proteaze in amilaze. Citolitični encimi katalizirajo razgradnjo celuloze in

hemiceluloze, proteaze katalizirajo razgradnjo proteinov do aminokislin ter amilaze razkrajajo škrob do maltoze oziroma glukoze. Produkt kaljenja je zeleni slad, ki ga pred skladiščenjem posušijo. Sušenje slada prepreči nadaljnje delovanje encimov in omogoča dolgotrajno skladiščenje. Proizvodnja piva se nadaljuje z varjenjem. Slad navlažijo in zmeljejo – drozganje. Sledi dvigovanje temperature in s tem pridobitev ugodnih pogojev za delovanje encimov. Pri nižjih temperaturah delujejo proteoličnih encimi, pri višjih temperaturah pa amilolitični encimi. Sledi precejanje, kjer se sladica loči od netopnih delcev. Dobljena tekočina se imenuje pivina. Med kuhanjem ji postopoma dodajajo hmelj. Hmeljeno pivino nato prečrpajo v posebno posodo, kjer poteka sedimentacija, izločanje koaguliranih beljakovin, ostankov hmelja in ječmena (Kako nastane pivo, 2015).

Sledi alkoholno vrenje pivine, kjer ohlajeni pivini ob prisotnosti zraka dodajo kvas. Kvasovke se najprej prilagajajo novemu okolju. V tej fazi še ne asimilirajo sladkorjev iz pivine, vendar energijo dobijo iz intracelularnega glikogena. Sledi faza rasti, kjer kvasovke intenzivno porabljajo kisik in sladkorje iz pivine ter tako pridobivajo na biomasi. Kisik je pomemben pri sintezi sterolov in nasičenih maščobnih kislin, ki so nujne za gradnjo celične membrane. Ko je biomasa dovolj namnožena, se začne faza fermentacije, kjer pride do porabe sladkorjev in nastajanja alkohola, ogljikovega dioksida in stranskih produktov, ki poskrbijo za organoleptične lastnosti piva (Vidgren, 2010). Spojine, ki vplivajo na končno aroma pivine so estri, višji alkoholi, žveplove spojine, organske kisline in karbonilne spojine. Estri dajo pivu sadno-cvetlično aroma. Nastanejo s kondenzacijo acilkoencima A in višjih alkoholov. Nastanek višjih alkoholov je povezan z biosintezo aminokislin. Kakovostno pivo vsebuje pravo razmerje omenjenih spojin. Glavno je, da neželene spojine ne presežejo dovoljene vrednosti. Ena od takih spojin so vicinalni diketoni, ki dajejo pivu maslen okus. Eden izmed njih je diacetil. Vsebnost omenjenih spojin je odvisna od več dejavnikov; sestava pivine, pogoji varjenja in sev kvasovk (He in sod., 2014).

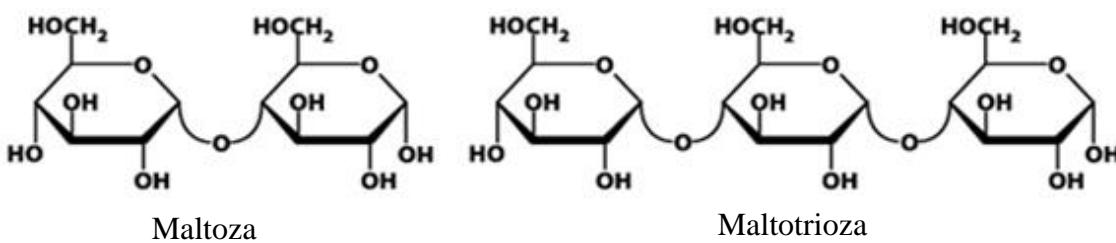
Glavna pot razgradnje sladkorjev je Embden-Mayerhoff-Parnass-ova (EMP) oz. glikolitična pot. To je glavna metabolna pot za pretvorbo glukoze do piruvata, pri kateri nastaja energija v obliki ATP, intermediati ter reduktivna moč v obliki NADH. Ločimo dva osnovna metabolna modela nadaljnje razgradnje piruvata: aerobni proces - respiracija (nastajanje biomase) ter anaerobni proces – fermentacija (nastajanje etanola) (Nelson in sod., 2008).

Po končanem vrenju nastane mlado pivo, ki ga ohladijo, mu odstranijo kvas ter ga prečrpajo v tanke za zorenje. Odstranjen kvas se ponovno uporabi pri naslednji fermentaciji. Mlado pivo je neuporabno, dokler vsebuje neželeno aromatično komponento diacetil. Da pivo med zorenjem pridobi vse svoje značilne lastnosti, je potrebno zagotoviti prave pogoje temperature, tlaka in časa. Zorenje pri kvasovkah spodnjega vrenja traja do tri tedne pri 0 °C (Vidgren, 2010). Preden pivo polnijo v določeno embalažo, ga

prefiltrirajo ter topotno obdelajo (pasterizacija). S tem podaljšajo trajnost piva in izboljšajo njegovo bistrost.

2.3 PORABA SLADKORJEV MED FERMENTACIJO

Da fermentacija za proizvodnjo piva lahko poteka, morajo biti v pivini prisotni enostavni sladkorji. Ti se s pomočjo metabolizma kvasovk pretvorijo v etanol in ogljikov dioksid ter druge stranske produkte. Pivina vsebuje več različnih sladkorjev; tako fermentabilne (70-80 %) kot nefermentabilne (20-30 %). Od vseh sladkorjev je v pivini največ maltoze, ki predstavlja 50-60 % fermentabilnih sladkorjev. Sledita ji maltotriosa (15-20 %) in glukoza (10-15 %). Poleg omenjenih sladkorjev se v pivini v nizkih koncentracijah nahajajo še fruktoza in saharoza (1-2 %). Nefermentativno frakcijo sladkorjev v veliki meri predstavljajo dekstrini, β -glukani, arabinoza in ksiloza (Zastrow in sod., 2000). Profil sladkorjev se razlikuje glede na uporabljeno surovino za pripravo slada (ječmen, pšenica) (He in sod., 2014).



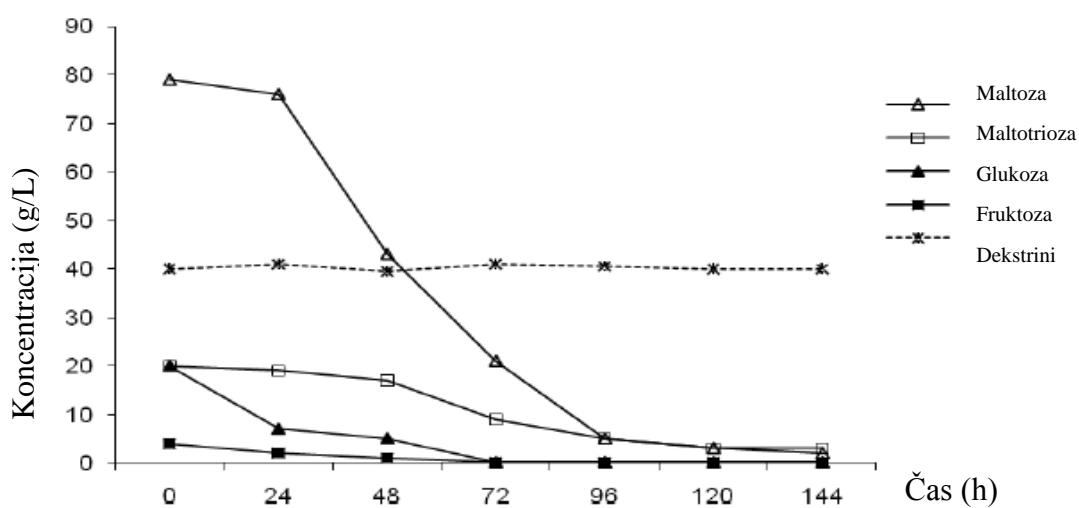
Slika 6: Strukturni formuli maltoze in maltotrioze (Steinbüchel, 2010)

Kvasovke maltozo in maltotriozo porabljajo tako, da ju s pomočjo citosolnega encima maltaze, razgradijo v glukozne ostanke. Molekule glukoze nato vstopijo v glikolizo, kjer se pretvorijo v piruvat, nato pa v energijo v obliki adenozin trifosfata (ATP). Pri tem pa nastaneta etanol in ogljikov dioksid (CO_2) kot presnovna odpadna produkta (Nelson in sod. 2008).

Transport sladkorjev v celico je prvi in hkrati najpomembnejši korak presnove sladkorjev. Sladkor mora preiti celično steno in membrano. Poznamo pasivni transport, ki poteka v smeri koncentracijskega gradiента in aktivni transport, ki poteka v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta, za kar je potrebna energija. Pretok molekul skozi plazemske membrano regulirajo integralni proteini. V sklop pasivnega transporta spada enostavna difuzija za prehajanje maščobnih kislin in plinov ter olajšana difuzija preko prenašalcev in kanalčkov. Pri slednji prehajajo majhne polarne molekule, kot so voda, sladkorji in aminokisline. Pri aktivnem transportu gre za prenos molekul proti koncentracijskemu gradientu ob porabi energije (ATP, svetloba). Prenašalce imenujemo črpalke. Nekateri transporterji so specifični za točno določen sladkor, spet drugi pa imajo širok spekter. Prenos maltoze in maltotrioze v celico poteka s pomočjo energijsko odvisnih

transporterjev, kjer poleg molekule maltoze oz. maltotrioze potuje še proton. Gre za elektrokemični transmembranski protonski gradient (Boyer, 2005).

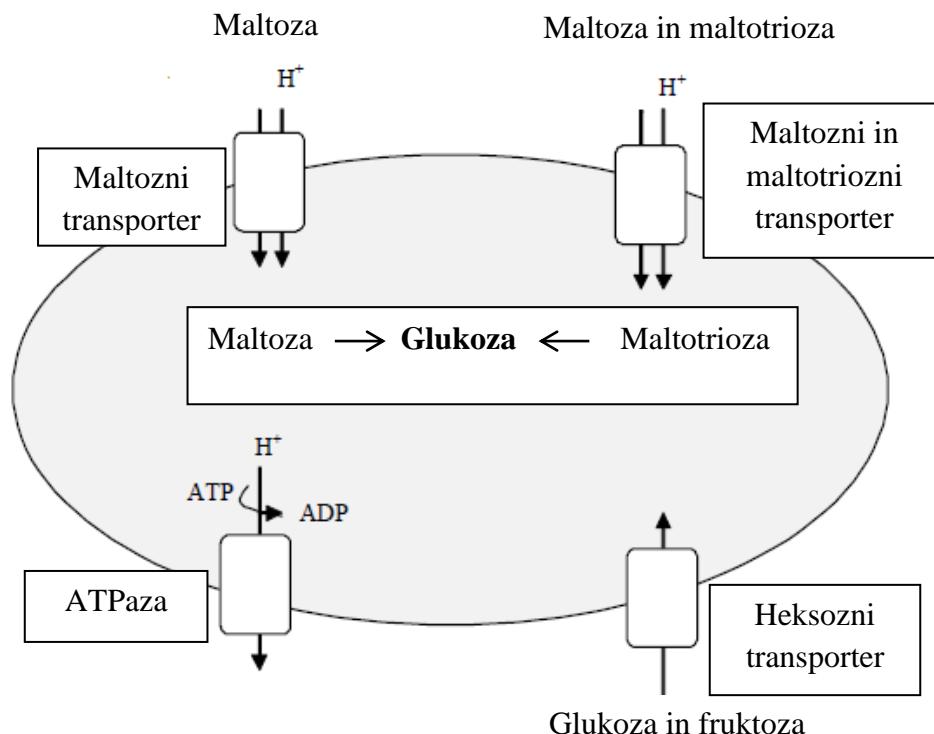
V pivini se najprej začne porabljati saharoza, ki se v pivini nahaja v zelo nizkih koncentracijah. Sledi poraba monosaharidov glukoze in fruktoze. Transport poteka skozi heksozni transporter, kjer gre za energijsko neodvisno pospešeno difuzijo. Dokler so v pivini na voljo monosaharidi, je sprejem alternativnih sladkorjev, kot sta maltoza in maltotriosa, onemogočen. Če sta v gojišču na voljo dva ali več virov ogljika, potem običajno zasledimo preferenčno rast na enem viru ogljika, kar imenujemo diauksična rast. Represijo genov, ki so odgovorni za porabo drugega vira ogljika, imenujemo katabolna represija (Gibson in sod., 2008).



Slika 7: Poraba sladkorjev v pivini (Vidgren, 2010)

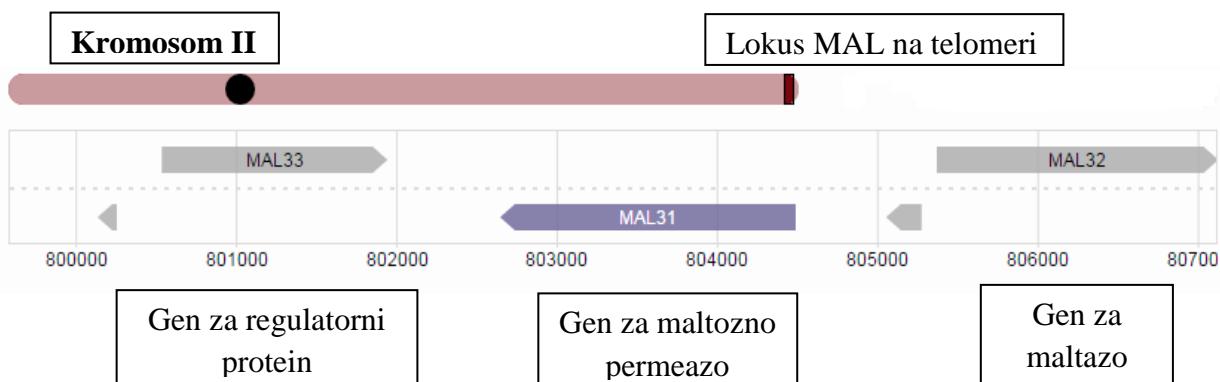
Iz Slike 7 je razvidno, da se poraba alternativnih sladkorjev začne, ko se v pivini porabi več kot polovica glukoze.

Čeprav je maltotriosa druga najpogostejša oblika sladkorja v pivini, ima najslabšo prioriteto za privzem v celico. Med primarno fermentacijo tako pogosto ostane neporabljenega. To negativno vpliva na sam proces in v končni fazi na kakovost piva. Vpliv se vidi predvsem na okusu piva, pokažejo se atypični profili okusa. Raziskave kažejo, da sta limitirajoča dejavnika porabe maltotrioze prisotnost kisika v pivini ter prenos maltotrioze v celico čez periplazmo. Do porabe maltotrioze pride šele v zadnji fazi fermentacije, takrat pa je kisik v pivini že porabljen. Pravijo, da je izražanje maltoznega transporterja eden od dejavnikov, ki najbolj limitira fermentacijo (Zastrow, 2000).



Slika 8: Transport sladkorjev v celico (Vidgren, 2010)

Geni za transporterje maltoze in maltotrioze se nahajajo znotraj lokusov MAL, poleg genov za maltaze in regulatorne proteine. Maltoza permeaza poskrbi za prenos maltoze čez celično membrano, maltaza pa maltozo razgradi na dve molekuli glukoze. Geni MAL so inducirani v prisotnosti maltoze. Znotraj genoma *S. cerevisiae* se nahaja 5 lokusov MAL, na kromosomih 7, 3, 2, 11 in 8. Vsi se nahajajo v bližini telomer, za katere je značilno, da so podvržene kromosomalnim spremembam (Chow, 1989). Gen MAL31, zanimiv v naši raziskavi, leži na kromosому 2. Tudi gen AGT1 leži znotraj MAL lokusa, in sicer na kromosomu 7.

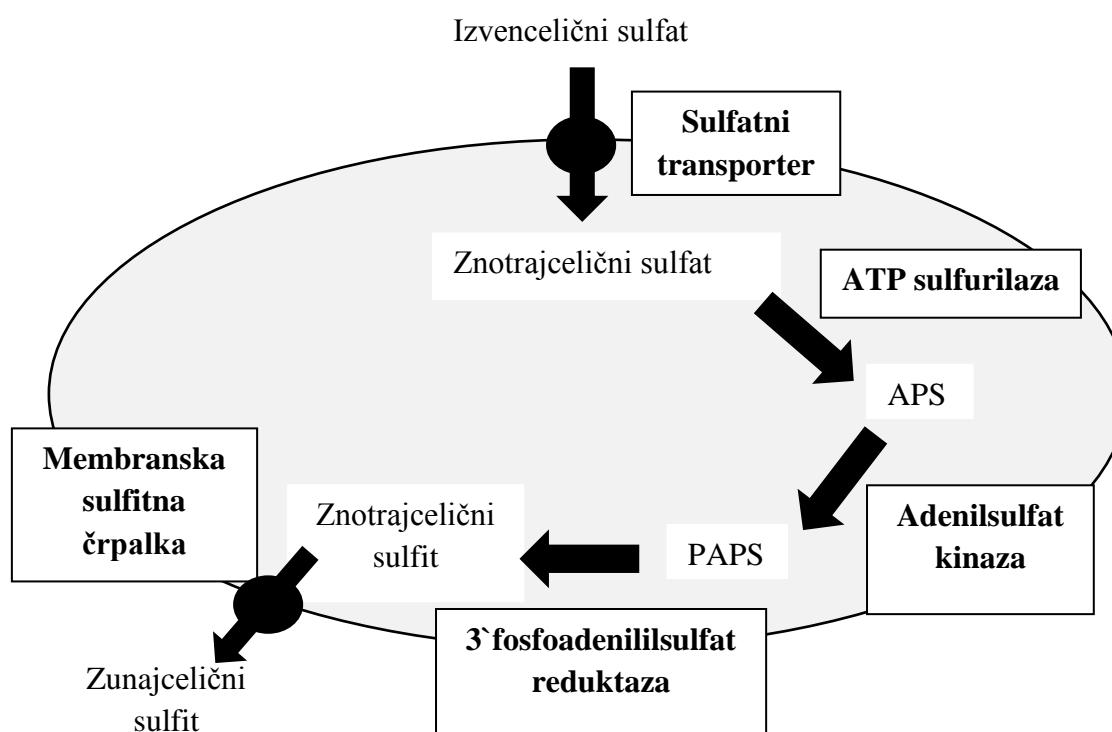


Slika 9: Lokus MAL na kromosomu II (SGD, 2015)

2.4 PRODUKCIJA SULFITA

Sulfit je ena izmed spojin, ki vplivajo na končno aroma piva. Med te spojine spadajo še estri, višji alkoholi, organske kisline karbonilne spojine in ostale žveplove spojine. Producija sulfita je zaradi antioksidativne aktivnosti pomembna za stabilnost okusa (He in sod., 2014).

Za kvasovke spodnjega vrenja je značilno, da proizvajajo velike količine sulfita v primerjavi z kvasovkami zgornjega vrenja. Večino genov, povezanih s sintezo sulfita, so kvasovke spodnjega vrenja pridobile od obeh genomov, tako *S. cerevisiae* in *S. eubayanus*, razen gena za 3`fosfoadenililsulfat reduktazo (MET16). Ta se v eni kopiji nahaja zaradi delecije znotraj kromosoma 16, kjer naj bi se nahajal gen za MET16 od *S. cerevisiae* (Nakao in sod., 2009).



Slika 10: Pot sinteze sulfita

Sulfit nastaja med sintezo aminokislin metionina in cisteina. Pot sinteze sulfita se začne tako, da v celico vstopi sulfat preko sulfatnih transporterjev (SUL1 in SUL2), ki se s pomočjo ATP sulfurilaze (MET3) pretvori v APS (adenilsulfat). Ta se nato fosforilira do PAPS (3`fosfoadenililsulfat) s pomočjo adenilsulfat kinaze (MET14). Sulfit nastane po redukciji PAPS z 3`fosfoadenililsulfat reduktazo (MET16). Sledi še samo prenos sulfita iz celice v okolico, preko membranskih sulfitnih črpalk (SSU1) (Nakao in sod., 2009).

2.5 ZAPOREDNA UPORABA IN STARANJE KVASOVK

V pivovarstvu se zaradi želje po znižanju stroškov poslužujejo zaporedne uporabe kvasovk. Po koncu fermentacije se kvasovke odvzamejo in shranijo do naslednje uporabe. Običajna praksa v pivovarnah je, da kvasovke zaporedoma uporabijo 8 do 15 – krat. Kako dolgo se neka kultura lahko uporablja, je odvisno od več dejavnikov. To so sama genetska narava seva, kvaliteta pobrane kvasne biomase, možnost okužbe, slabitev fermentacijskih sposobnosti, spremembe v kemični sestavi končnega produkta in nadzor v podjetju (Deželak in sod., 2014).

Najpomembnejše lastnosti, pomembne pri pivovarstvu, so zmožnost ločitve kvasa od piva, hitra in učinkovita poraba sladkorjev ter pridobitev produkta z visoko vrednostjo etanola in pravim razmerjem aromatičnih spojin (Deželak, 2014).

Bühlig in sod. (2013) opisujejo tri poglavitne spremembe kvasovk, za katere lahko rečemo, da so označevalci sposobnosti fermentacije:

- nezmožnost flokulacije (flokulacija je za pivovarje pomembna zaradi bistrosti piva in s tem manjše potrebe po filtraciji ter lažjega odvzema kvasne biomase po fermentaciji),
- staranje celic (replikativno in kronološko staranje),
- poslabšanje celic zaradi abiotskih sprememb (aerobno/anaerobno okolje, visok osmotski stres, pomanjkanje hranil, proizvodnja etanola, visok hidrostatski tlak).

Staranje in odgovor na stres se pri kvasovkah izrazita kot spremembe v velikosti celic, kromosomov, strukturi celične stene, generacijskem času, izražanju genov, sintezi proteinov (Deželak in sod., 2014), flokulaciji, porabi sladkorjev, redukciji diacetila in kopičenju »petit« mutant (poškodbe na kristah mitohondrijev) (Powell in Diacetis, 2007). Deželak in sod. (2014) so ugotovili, da se med zaporedno uporabo spremnjata tudi kariotip ter proteinski profil kvasne biomase.

Jenkins in sod. (2003) pravijo, da stres vpliva na kopičenje, tako reverzibilnih kot irreverzibilnih sprememb. Med zaporedno uporabo gredo kvasne celice skozi več fizioloških faz: aktivna rast, delitve med propagacijo in začetno fermentacijo, rast na različnih sladkorjih, stacionarna faza med fermetacijo in spiranje s kislino; in so tako izpostavljene različni okoljem. Vse to privede do poslabšanja ali celo umiranja celic. Čeprav celice ves čas umirajo, se preživelost ne zmanjšuje, saj se celice ves čas razmnožujejo. Tekom ene fermentacije se celica deli dva do trikrat. Poznamo dve osnovni poti, ki vodita v celično smrt; to sta senescenca in nekroza. Senescenca je genetsko kontrolirana in se zgodi, ko se preseže vnaprej predvideno število delitev (Hayflick limit). To je nekje med 10 in 30 delitev (Powell in sod., 2000). Pri nekrozi gre za trajno prekinitev pomnoževanja, ki vodi do prezgodnje smrti. Do tega pride zaradi delecije ali okvare ključnih genov v celici, spremembe integritete organelov, nepopravljivih poškodb DNA.

Vzrok teh sprememb je izpostavljenost stresu med fermentacijo, shranjevanjem in odvezemanjem kvasne biomase (Preglednica 1). Izpostavljenost stresu pa lahko privede tudi do genetskih, metabolnih in fizioloških sprememb (Jenkins in sod., 2003).

Preglednica 1: Izpostavljenost stresu med uporabo kvasovk (Jenkins in sod., 2003)

Fermentacija	Shranjevanje	Odvzem kvasne biomase
Oksidativni stres	Stradanje	Spiranje s kislino
Osmotski stres	Strižne sile	Strižne sile
pH	Etanol	Oksidativni stres
Etanol	pH	Osmotski stres
Hidrostaticni stres	Hladni šok	
Pomanjanje hrani		

Za nastanek dobrega piva je potrebno med samo proizvodnjo meriti kakovost kvasne biomase. Da je kvasna biomasa definirana kot kakovostna, mora biti čista, stabilna ter v dobrem fiziološkem stanju (Jenkins in sod., 2003).

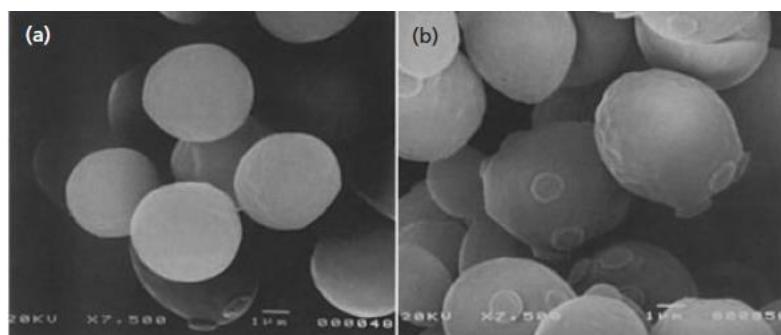
2.5.1 Flokulacija in sedimentacija

Kvas je potrebno po končani fermentaciji odvzeti iz fermentacijskih tankov, da se ga lahko uporabi večkrat zapored. Odvzem kvasa ne bi bil mogoč, če se posamezne celice kvasa ne bi združevale v flokule ali skupke. Nastali skupek lahko vsebuje tisoče celic in pospeši posedanje celic na dno konusnih fermentorjev, v primeru lager kvasovk. Flokulacijske značilnosti so odvisne od samega seva (izražanje genov FLO) ter okoljskih dejavnikov. Pomembno je, da do flokulacije ne pride prehitro, saj ima to vpliv na samo pivo. Pri zaporedni uporabi kvasa je idealno, da se flokulacijske značilnosti ne spreminja (Vidgren in sod., 2011).

Najpogostejši mehanizem flokulacije je adhezija s pomočjo lektina. Celice morajo na svoji površini izražati proteine flokuline, ki se vežejo na manozne ostanke sosednjih celic. Za to vezavo so potrebni kalcijevi ioni, ki poskrbijo za pravilno konformacijo flokulina. Flokulacija je reverzibilen pojav, saj lahko skupke razgradimo z dodatkom kelatorjev (odstranijo kalcijeve ione) ali manoze (zamenja manozne ostanke na celicah) (Stratford, 1992).

Hitrost sedimentacije je odvisna tudi od starosti celic. Najhitreje sedimentirajo stare celice, nato srednje stare in nazadnje najmlajše (hčerinske) celice. Med zbiranjem celic iz cilindro-koničnih tankov pridobijo dve frakciji celic. Prva, neuporabna frakcija, je sestavljena iz velikih, mrtvih celic ter proteinov. Drugo, uporabno frakcijo pa sestavljajo srednje stare in nove hčerinske celice. Takšna nova populacija je sestavljena iz 50 % novih celic, 25 % celic prve generacije in 12,5 % druge generacije, itd. Stare celice se hitreje posedajo, zaradi grobe celične površine. To je posledica številnih delitev celic. Takšna celična površina ima afiniteto do medceličnih povezav. Če se med zaporedno uporabo ne

odstranjuje starih celic, lahko pride do prehitre flokulacije in posledično do nepopolne fermentacije (Powell in sod., 2000).



Slika 11: Prikaz novih hčerinskih celic (a) in starih materinskih celic (b) po šestih delitvah (Powell in sod., 2000)

2.5.2 Shranjevanje kvasne biomase pred ponovno uporabo

Med ponovno uporabo kvasa za naslednjo fermentacijo so pogoji, v katerih je kvasna biomasa shranjena, zelo pomembni. Pod temi pogoji mora kvasovka vzdrževati aktivnost v okolju, kjer je na razpolago malo hranič in relativno visoka vsebnost potencialno toksičnega etanola. Interna zaloga glikogena je za kvasovko v takih pogojih zelo pomembna, ker je porabljen za vzdrževanje ključnih celičnih metabolnih funkcij. Zelo pomembna je tudi temperatura shranjevanja kvasa. Kvasovke, ki imajo nizko vsebnost glikogena in so bile shranjene pri višjih temperaturah, imajo slabo sposobnost fermentacije. Najboljši pogoji za shranjevanje kvasa so temperatura 4 °C, brez prisotnosti kisika in zmerno mešanje. Tako se doseže homogenost kvasne biomase, brez vpliva na njeno kakovost (Kočar, 2012).

2.5.3 Genetske spremembe

Čeprav v začetni fazni zaporedne uporabe kvasovk ni mogoče opaziti nobenih fizičnih sprememb, se mutacije dogajajo. Te spremembe v genomu niso takoj opazne in ne vplivajo neposredno na kakovost produkta. Toda med zaporedno uporabo se te mutante kopijojo in lahko tekmujejo z izvorno kulturo. V končni fazni lahko mutante prevladajo. Nastale mutante imajo lahko boljše ali slabše lastnosti od izvorne kulture. S pomočjo selekcije je mogoče dobre mutante pripeljati do boljših producentk (Powell in Diacetis, 2007).

2.5.3.1 Spremembe na nivoju mikrosatelitov

Ponovljive sekvene so značilne tako za prokariontske kot tudi evkariontske celice. Genom kvasovk naravno vsebuje veliko število teh sekvens, ki se nahajajo znotraj vseh kromosomov. Te tandemsko ponovljive sekvene se dalje delijo na minisatelite, kjer je enota ponovitve daljša od 9 bp in mikrosatelite, kjer je enota ponovitve dolga od 2-8 bp (Legendre in sod., 2007).

Mikrosatelite najdemo tudi pod različnimi imeni kot so:

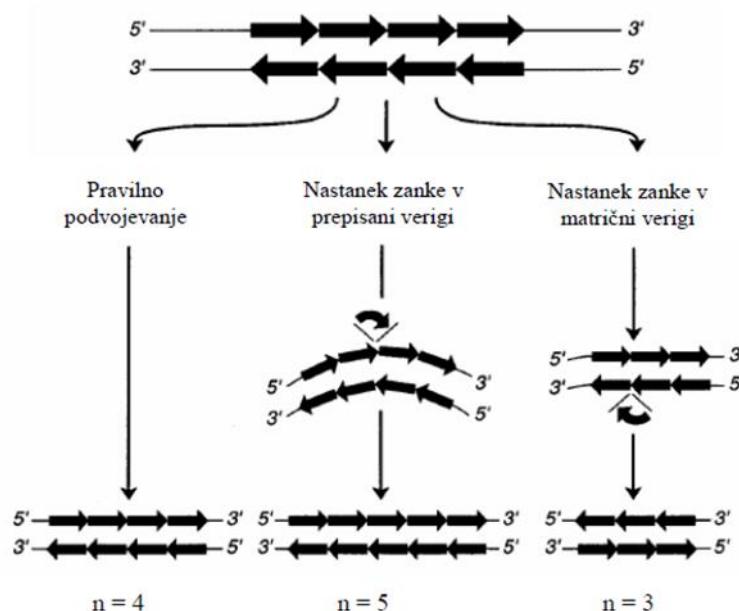
- enostavna zaporedja (SSR; simple sequence repeats),
- kratke tandemske ponovitve (STRs; short tandem repeats) in
- spremenljivo število tandemskih ponovitev (VNTRs; variable number of tandem repeats) (Štajner, 2010).

Mikrosatelite delimo na popolne (sestavljeni samo iz enega motiva osnovne ponovitve, ki se ponavlja brez prekinitve), nepopolne (ena ali več ponovitev vsebuje bazo, ki ne odgovarja osnovnemu motivu ponovitve), prekinjene (vsebujejo krajšo insercijo baznih parov, ki se ne ujemajo z osnovnim motivom ponovitve) in sestavljenе (vključujejo dva ali več mikrosatelitev, ki pa se med seboj razlikujejo po tipu ali motivu ponovitve) (Štajner, 2010).

V ponovljivih sekvenkah zaradi njihove značilne strukture pogosto prihaja do rekombinacij in zdrsov, kar privede do nastanka novih alelov, ki se razlikujejo v številu ponovitev osnovne enote. Zaradi nestabilnosti so te ponovljive sekvene pomembne pri genotipizaciji. Mutacijska stopnja je pri ponovljivih sekvenkah 10 do 10000-krat višja kot pri neponovljivih sekvenkah (Legendre in sod., 2007).

V večini primerov se mikrosateliți nahajajo v intergenskih regijah, vendar se pojavljajo tudi v kodirajočih regijah in psevdogenih. V genomu kvasovke *S. cerevisiae* se največ mikrosatelitev nahaja v genih, ki kodirajo proteine celične stene. Zaradi hipervariabilnosti genov, ki jo omogočajo spremembe ponovljivih sekvenč, so kvasne celice sposobne hitrega prilagajanja na spremembe v okolju. Na primer, spremembe ponovljivih sekvenč znotraj FLO1 in FLO11 genov pripeljejo do sprememb celične stene in tako pospešijo adhezijo in tvorbo biofilmov, kar je pomembna lastnost pri flokulaciji (Legendre in sod., 2007).

Do variabilnosti pri mikrosatelitev v večini primerov pride zaradi zdrsa DNA polimeraze in posledično nepravilnega parjenja med replikacijo ter neučinkovitega DNA replikacijskega popravljalnega mehanizma. Nepravilno parjenje vijačnice med sintezo DNA zaradi zdrsa polimeraze DNA se pri mikrosateliitu kaže v pridobitvi ali izgubi ene ali več ponovitev. Ali se bo mikrosateliit daljšal ali krajsal pa je odvisno od tega ali nastane zanka v na novo sintetizirani veriga DNA ali v matrični verigi (Schlotterer in Harr, 2001). DNA popravljalni proteini pri kvasovkah nastalo zanko zaznajo in jo popravijo tako da dodajo manjkajoče ali odstranijo odvečne baze. Minimalno so sposobni zaznati že dve bazi v nastali zanki, maksimalno število pa ni znano (Sia, 1997).



Slika 12: Zdrs polimeraze in povečano ali zmanjšano število ponovitev mikrosatelita (Štajner, 2010)

Wren in sod. (2000) so prvi opisali nabor pravil pri napovedovanju hipervariabilnosti mikrosatelitev. Pri dinukleotidnih ponovitvah mora biti prisotnih vsaj 8 enot, 7 enot za trimere, 6 za tetramere, 5 za pentamere itd.

Legendre in sod. (2007) so s pomočjo modelov in algoritmov v genomu kvasovke *S. cerevisiae* določili 2743 ponovljivih sekvenc, 242 teh pa so ugotovili kot variabilne, saj se razlikujejo med tremi sevi *S. cerevisiae*. Njihove analize so pokazale, da so za nestabilnost oz. stabilnost ponovljivih sekvenc odgovorna število ponovitev in dolžina enote. Prav tako pa lahko na stabilnost vplivajo tudi drugi dejavniki, kot je na primer vsebnost GC nukleotidov. Pravijo, da variabilnost eksponentno narašča s številom ponovitev.

Publikacij, ki bi opisovale spremembe v številu ponovitev mikrosatelitskih zaporedij med zaporedno uporabo kvasa, ni mogoče najti. V večini primerov so mikrosateli opisani kot molekularna metoda za karakterizacijo in identifikacijo sevov.

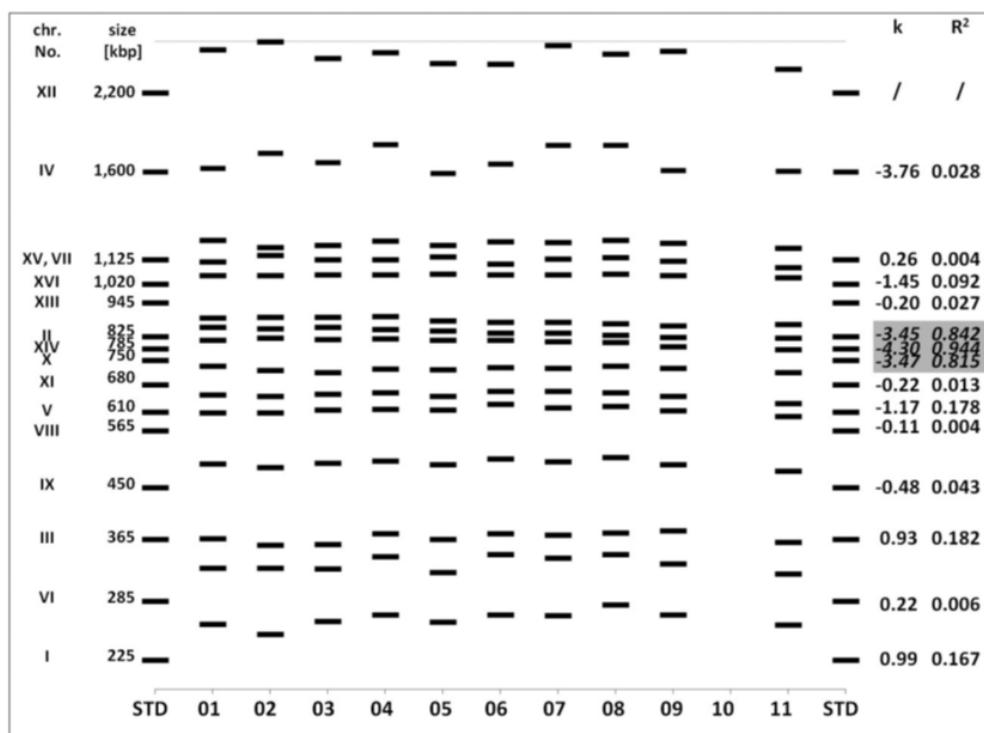
2.5.3.2 Spremembe na nivoju kromosomov

Elektroforetska kariotipizacija je metoda, s katero z gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju ločimo intaktno kromosomsko DNA. Prikaz intaktnih kromosomov imenujemo elektroforetski kariotip.

Pulzna elektroforeza se loči od običajne elektroforeze po periodičnem spremenjanju smeri električnega polja, kar omogoča neprekinitno preorientiranje molekule DNA in njeno cik-cak gibanje po gelu. Lahko držimo konstanten tok pri spremnjajoči se napetosti ali pa je napetost stalna in periodično niha električni tok (Bustamante in sod., 1993). Hitrost potovanja je odvisna od časa, ki ga molekula porabi za reorientacijo, od napetosti med

dvema elektrodamama, predvsem pa od velikosti in oblike potujoče molekule (Povhe Jemec, 2003).

Deželak in sod. (2014) so ugotovili, da se med zaporedno uporabo *S. pastorianus* pri fermentaciji ječmena in drugih žit, ki ne vsebujejo glutena, spreminja kariotip kvasne biomase. S pomočjo pulzne elektroforeze jim je uspelo ločiti 15 različnih elektroforetskih lis. Vzorec elektroforetskih lis je podoben kot pri *S. cerevisiae*, le da so velikosti 5 do 10 % večje. Morebiten razlog slabe kakovosti in ločljivosti rezultatov so nečistoče, ki izhajajo iz produkcijskega gojišča. V večini primerov, celokupno gledano, se tekom zaporedne uporabe kvasa, velikost kromosomov zmanjšuje. Morebiten razlog tega pojava so telomere in njihovo krajšanje ob vsaki delitvi. Poleg tega pa evkarionti vsebujejo tudi encim telomerazo, ki dodaja DNA ponovitve na konec linearnih kromosomov in tako povzroči podaljševanje telomer. Lahko pa se zgodi, da se telomeraza veže izven telomerne regije in tam doda ponovitve, kar privede do povečanja kromosoma. Spremembe v subtelomernih regijah so še toliko bolj zanimive, ker se znotraj njih nahaja veliko genov, ki so pomembni pri proizvodnji piva. To so geni za fermentacijo maltoze, produkcijo sulfita, flokulacijo itd. Iz slike je razvidno, da so spremembam najbolj podvrženi kromosomi I, IV in XII.

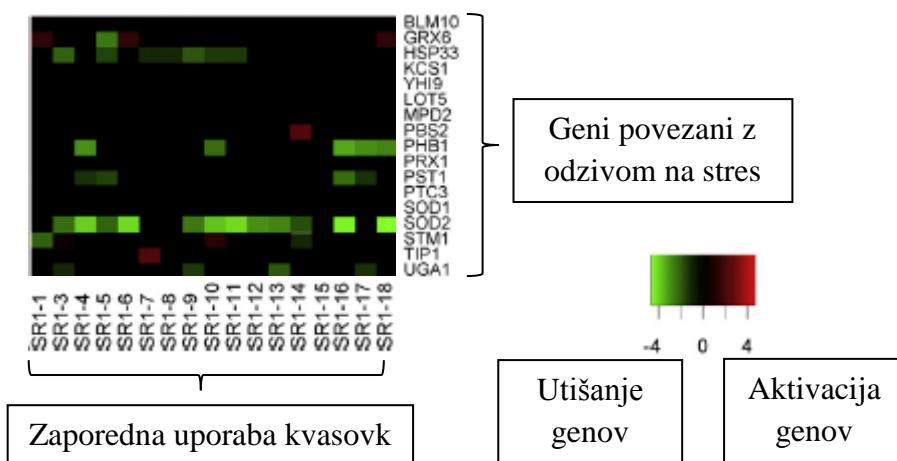


Slika 13: Shematska predstavitev kariotipov ob zaporedni uporabi *S. pastorianus* pri fermentaciji ječmena (11 zaporednih uporab) (Deželak in sod., 2014)

2.5.3.3 Spremembe v izražanju genov

Do sedaj je večina raziskav o izražanju genov med fermentacijo piva potekalo s pomočjo RNA mikromrež. Ugotovili so, da se nivo izražanja genov za sintezo proteinov, respiracijo in sintezo maščobnih kislin poveča v prvih dveh dneh fermentacije, kar je povezano z začetno rastjo kvasovk. Izražanje teh genov med fermentacijo upade, pride pa do povečanega izražanja drugih genov. V kasnejših fazah fermentacije so zaznali utišanje genov za odziv na stres, proteinov topotnega šoka in alkoholne dehidrogenaze. Izražanje genov za aldehidne dehidrogenaze pa se je povečalo. Prav tako se je v zadnjih fazah povečalo izražanje genov za preprečevanje oksidativnega stresa, kar je povezano s povečano koncentracijo etanola (Wendland, 2014).

Bühligen in sod. (2013) so s pomočjo mikromrež preučevali izražanje genov med neodvisnimi zaporednimi uporabami kvasovk. Za potrditev rezultatov, dobljenih z mikromrežami, so naredili še kvantitativni PCR. Osredotočili so se na izražanje genov povezanih z metabolizmom, prenosom sladkorjev, staranjem, flokulacijo, odzivom na stres ter spremembami okoljskih pogojev. Vzorce so pridobili ob koncu fermentacije.



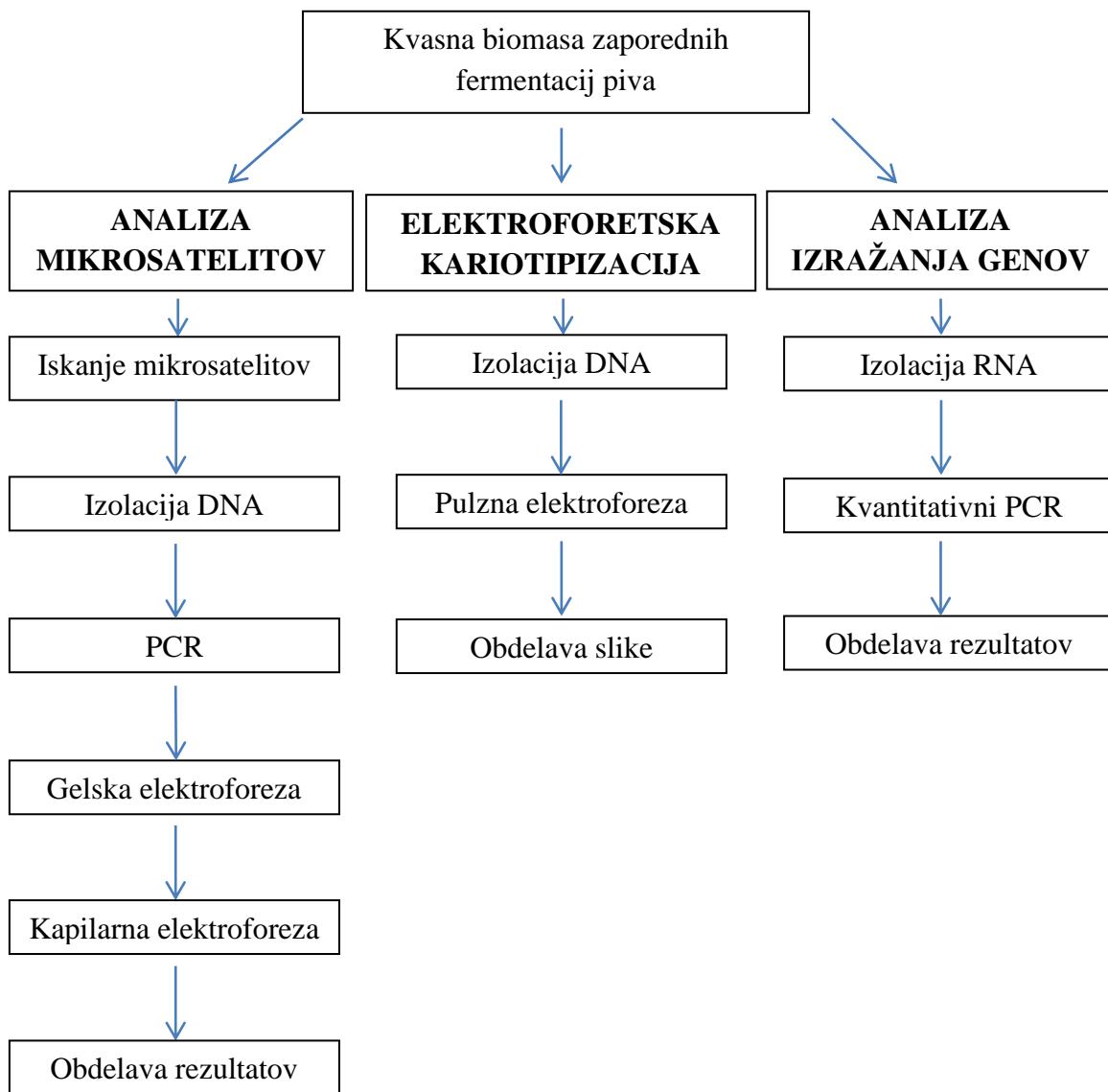
Slika 14: Ekspresijski profil izražanja genov, povezanih z odzivom na stres, med zaporedno uporabo (Bühligen in sod., 2013)

Ugotovili so, da so profili izražanja stabilni in neodvisni od števila zaporednih uporab. Ni jim uspelo ugotoviti sprememb pri flokulaciji in staranju, so pa opazili spremembe pri odzivu na stres. V primeru povečane koncentracije kisika v fazi prezračevanja pivine se poveča izražanje genov za oksidativni stres. To ima pozitiven vpliv na kakovost piva (Bühligen in sod., 2013).

Podobno so tudi Bühligen in sod. (2014) preučevali staranje med zaporedno uporabo kvasovk. Poleg ekspresije genov so gledali tudi število brazd na celicah ter velikost celic. Transkriptomska analiza je pokazala, da od šeste zaporedne uporabe naprej pride do pozitivnega genskega izražanja predvsem v genih za metabolizem trehaloze in glikogena.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 15: Shema eksperimentalnega dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Vzorci

V Pivovarni Laško so vzorčili kvasno biomaso v eksponentni fazì rasti v šestih izmed petnajstih zaporednih fermentacij. Vzorce pivine so zamrznili v tekočem dušiku, ter jih shranili v zamrzovalni skrinji pri -80 °C. Vzorčenje je potekalo v prvi (A), četrtni (D), dvanajsti (L), trinajsti (M), štirinajsti (N) in petnajsti (O) zaporedni fermentaciji, pri katerih so uporabili isto biomaso.

Preglednica 2: Koncentracija celic v vzorcih

Zaporedna uporaba	Koncentracija celic (celic/mL)
Prva (A)	$24 \cdot 10^6$
Četrta (D)	$21 \cdot 10^6$
Dvanajsta (L)	$24 \cdot 10^6$
Trinajsta (M)	$22 \cdot 10^6$
Štirinajsta (N)	$23 \cdot 10^6$
Petnajsta (O)	$22 \cdot 10^6$

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

- gojišče YPD (Sigma), 2 % (w/v) agar

3.2.3 Laboratorijski material

- Rokavice
- Laboratorijska halja
- Digitalne, multikanalne pipete (Eppendorf)
- Avtomatske pipete (Gilson)
- Nastavki za pipete (Eppendorf, Gilson)
- Mikrocentrifugirke in centrifugirke
- Material za PCR
- Cepilne zanke in razmazovalne palčke (Golias)
- Laboratorijska steklovina
- Petrijeve plošče
- Vatirane palčke
- Steklene kroglice
- Nosilci za agarozni gel in glavnički pri gelski elektroforezi
- Nosilci za agarozni gel, glavniček in kalup za blokce pri pulzni elektroforezi
- Stojala za centrifugirke in mikrocentrifugirke
- Kovinske žlice
- Nitrozocelulozni filter (Sartorius)

3.2.4 Laboratorijska oprema

- Računalnik
- Tehnica (Exacta, Mono BIOC)
- Hladilnik in zamrzovalne skrinje (Gorenje)
- Mikrovalovna pečica (Sanyo)
- Vodna kopel (Julabo, Kambič)
- Elektroforetske banjice (Bio-Rad)
- Generator za elektroforezo (Bio-Rad)
- Komora za fotografiranje gela (GelDoc 2000, Bio-Rad)
- Spektrofotometer (Lambda Bio, Perkin Elmer)
- Centrifuge (5415 C Mini Spin plus, Eppendorf)
- Vrtičnik (IKA, Yellowline TTS 2)
- Naprava za PCR (iCycler, Bio-Rad)
- Naprava za kvantitativni PCR (ABI 7500, Applied Biosystems)
- Inkubator (Kambič)
- Naprava za pulzno elektroforezo (CHEF-DR III System, Bio-Rad)
- Brezprašna komora (SMBC 122AV, Iskra Pio)
- Avtoklav (Sutjeska)
- Termomikser (Thermomikser comfort, Eppendorf)
- Naprava za mehansko razbijanje celic (Next Advance, Bullet Blender, Storm 24)
- pH-meter (Mettler-Toledo)
- Pečica

3.2.5 Kemikalije in pufri

Za izolacijo DNA z MasterPure kompletom (Epicentre):

- Raztopina za lizo celic
- RNaza A (v 50 % glicerolu, vsebuje 25 mM natrijevega acetata (pH 4.5))
- Reagent za precipitacijo proteinov
- Izopropanol
- 70 % etanol
- Pufer TE (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA)

Za reakcijo PCR:

- Voda PCR (Sigma Aldrich)
- Pufer PCR 5x Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega)
- MgCl₂ (Promega)
- Mešanica dNTP (Roche)
- Začetni oligonukleotidi (Macrogen)
- Univerzalni začetni oligonukleotid (Macrogen)
- Polimeraza DNA GoTaq® Flexi (Promega)

- Pufer FastStart High Fidelity Reaction z 1mM MgCl₂ (Roche)
- Mešanica encimov FastStart High Fidelity (Roche)
- DMSO (Roche)

Za vizualizacijo pomnožkov DNA:

- Agaroza (Sigma Aldrich)
- 50x pufer TAE (40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA) (Merck)
- Barvilo DNA za gele SYBR® Safe (Life Technologies)
- Velikostni standard GeneRuler™ (Life Technologies)

Za elektroforetsko kariotipizacijo:

- 1 M EDTA pH 7,5
- 1 M Tris/HCl pH 8
- 20 % Na-lauril sarkozin
- CPES (1,23 g citronske kisline, 2,14 g Na₂HPO, 21,9 g sorbitola, dH₂O do 50 mL)
- CPE (1,23 g citronske kisline, 2,14 g Na₂HPO, dH₂O do 50 mL)
- Raztopina 3 (45 mL 0,5 M EDTA (pH 9), 0,5 mL Tris/HCl, 2,5 mL Na-lauril-sarkozin, 2 mL sterilne vode)
- Ditiotreitol DTT
- Agaroza LMP
- Novo Zym 234 (Sigma Aldrich)
- Proteinaza K
- 0,5x TBE pufer (0,045 M Tris, 0,045 M H₃BO₃, 1 mM EDTA)
- Označevalec dolžin DNA za CHEF (Bio-Rad)
- Barvilo Gel Red (Biotium)

Pufre smo avtoklavirali pod pogoji 1,1 bar, 110 °C, 15 min ter jih shranili v hladilniku. Na-lauril-sarkozin smo sterilno filtrirali skozi nitrozo-celulozni filter z velikostjo por 0,2 µm.

Za izolacijo RNA z kompletoma RNeasy Mini Kit (Qiagen) in On-Column Dnase I Digestion Set (Sigma) in njeno ločevanje:

- Pufer RLT
- β-merkaptetoetanol
- 70 % etanol
- Pufer RW1
- Inkubacijska mešanica DNase I
- Pufer RPE
- Voda brez RNaz
- Nanašalni pufer za gelsko elektroforezo - RNA Gel Loading Dye - vsebuje bromfenol modro in ksilan cianol (Life Technologies)

Za sintezo cDNA s SuperScript VILO (Invitrogen):

- Reakcijska mešanica 5x VILO
- Encimska mešanica SuperScript
- Voda DEPC

Za kvantitativni PCR z Express qPCR Supermix (Invitrogen):

- Mešanica Express qPCR
- Barvilo ROX
- Voda PCR
- Začetni oligonukleotidi (Macrogen)
- Hibridizacijska sonda (Macrogen)

3.2.6 Računalniški programi, baze podatkov in spletne strani

- Quantity One 4.2.3. (Bio-Rad)
- BioNumerics 7.1 (Applied Maths)
- qBase+ (Biogazelle)
- Microsoft Office Excel (Microsoft)
- Saccharomyces Genome Database (<http://www.yeastgenome.org/>)
- Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>)
- WebSat (<http://wsmartins.net/websat/>)
- BLAST (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.3 METODE

3.3.1 Analiza mikrosatelitov

3.3.1.1 Izolacija DNA

Za izolacijo DNA kvasne biomase iz pivine smo uporabili komplet MasterPure (Epicentre). V 1,5 mL mikrocentrifugirko smo dali 300 µL raztopine za lizo celic, 1 µL RNAze A (5 µg/µL), 10 µL pivine (nekje $23 \cdot 10^4$ celic) ter celice dobro premešali na vrtičniku. Celice smo najprej 15 min inkubirali pri 65 °C nato pa 5 min na ledu. Nato smo celicam dodali 150 µL reagenta za precipitacijo proteinov in mešali z vrtičnikom 10 s. Odcentrifugirali smo ostanke celic pri 10.000 obr/min, 10 min. Supernatant smo prenesli v svežo 1,5 mL mikrocentrifugirko, dodali 500 µL izopropanola ter premešali z obračanjem. Centrifugirali smo pri 10.000 obr/min, 10 min. S pipeto smo odstranili supernatant ter ga zavrgli. Sediment smo sprali z 0,6 mL 70 % etanola. Centrifugirali smo pri 10.000 obr/min, 3 min ter etanol popolnoma odstranili. DNA smo resuspendirali v 35 µL pufru TE.

3.3.1.2 Merjenje koncentracije DNA

Koncentracijo DNA in njeno čistost smo merili s pomočjo naprave Lambda Bio. Pri merjenju so bile pomembne nastavitev, kot so: pot žarka (10 mm), faktor redčitve (50, pri nanosu do 2 µL) ter faktor biološke molekule (50 za DNA).

Na nosilno celico smo nanašali 1,5 µL DNA ter vmes čistili z etanolom. Napravo smo na začetku umerili z 1,5 µL destilirane vode.

3.3.1.3 Iskanje mikrosatelitov ter izbira začetnih oligonukleotidov

S programom WebSat (A Web Software for MicroSatellite Marker Development) (Martinez in sod., 2009) smo v genomu kvasovke *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 (ABPO00000000) poiskali vse mikrosatelite ter jim določili začetne oligonukleotide, pod kriteriji:

Dolžina motivov: dva, trije, štirje, pet, šest

Minimalno število ponovitev: 6

Minimalna velikost začetnega oligonukleotida: 18

Maksimalna velikost začetnega oligonukleotida: 27

Velikost produkta: 100-300 ali izjemoma 100-400

Metoda je zelo preprosta, saj v program le vnesemo nukleotidno zaporedje genoma v formatu FASTA in program nam poišče vse mikrosatelite ter določi začetne oligonukleotide. S pomočjo tega programa smo v celotnem genomu določili 1424 mikrosatelitov. Ker je to precej velika številka, smo se odločili, da se omejimo pri izboru. Za nadaljnjo analizo smo izbrali le mikrosatelite, ki se nahajajo v neposredni bližini genov,

ki so pomembni v pivovarstvu. Na podlagi publikacije Nakao in sod., (2009) smo izbrali gene za transport maltoze in maltotrioze ter proizvodnjo sulfita.

Preglednica 3: Tehnološko pomembni geni

	Protein	Ime gena
Geni za α-glukozidne transporterje	Maltozna permeaza	MAL31
	Visokoafinitetni maltozni transporter	AGT1
	α -glukozidna permeaza	MPH2
Geni, povezani s sintezo sulfita	Visokoafinitetna sulfatna permeaza	SUL1
	Visokoafinitetna sulfatna permeaza	SUL2
	ATP sulfurilaza	MET3
	Adenilsulfat kinaza	MET14
	3`fosfoadenililsulfat reduktaza	MET16
	Membranska sulfitna črpalka	SSU1

Najprej smo poiskali nukleotidna zaporedja teh genov v bazi podatkov SGD; *Saccharomyces* GENOME DATABASE, nato pa smo s pomočjo programa BLAST določili, kje v genomu kvasovke *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 (ABPO00000000) se nahajajo. Glede na to lokacijo smo izbrali odseke genoma, v velikosti okoli 20.000 bp ali izjemoma 40.000 bp. Na takšen način smo število mikrosatelitov omejili na 37. Vsi izbrani mikrosatelični ležijo v medgenskih regijah. Za 9 izbranih mikrosatelitov smo naročili začetne oligonukleotide označene z fluorescentno oznako. Za ostalih 28 pa smo izbrali cenejšo izvedbo iz publikacije Schuelke (2000), kjer začetni oligonukleotidi niso neposredno označeni z fluorescenco, vendar se ti označijo med samo reakcijo PCR, s pomočjo univerzalnih sekvenc.

Preglednica 4: Seznam mikrosatelitov, ki se nanašajo na kvasovko *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 (ABPO00000000)

Št.	Gen	Kontig	Nahajanje gena	Mikrosatelit	Velikost (bp)	Sp. začetni oligonukleotid	Za. začetni oligonukleotid	
1	AGT1	39	4226-5840	(AC) ₁₂	291	GTTAGGTAGGCAGGAATCGAAA	GCCGTGCAATTGTAATCTCTT	KLASIČNI PCR
2	MAL31	412	1-1093	(AT) ₁₃	192	CITTGACATTCCTGTCCTCGTG	CGGAGGTTATCTCACCCCTAT	
3	MET3	69	13016-14551	(TAT) ₁₁	297	TCGATTATTTGATGGAGCTGG	CAATGCTAAAGGACACCAAGAA	
4	MET14	46	292204-292806	(TA) ₁₅	234	AGGTGTGAAGAGGGCTTAATGA	GAAAACACGAGTGGAAAGAAAGC	
5	MET16	883	3055-3828	(AT) ₁₇	266	CTGTCGGCTATAGGTTGATT	ACCAGCGTATGATTGTCGTAT	
6	SUL2	92	24432-27113	(GTTGCT) ₁₁	273	GCATCATTATTACCGACATGA	ACATCACAAAGCATCAATCCAAC	
7	SUL1	16	13411-15967	(CAA) ₄₄	255	GGCATCAAGTCAAATACAACA	CAACAGTAGGATGGAAATGGT	
8	SSU1	257	13944-15320	(TA) ₁₂	262	TGCCATTATTCTCTCAGCCTTT	CTTGCCTCTATGACCCAGTCC	
9	/	/		(TTA) ₇₇	355	CTTATACTCATGCAGATTGTTGGGT	TATCCTTAGAACAGCGGAAAG	
10	AGT1	21	5161-7012	(TA) ₁₁	174	CCCCGCCAGAACATAAG	TGTCTGTGTTGGTCTGTTGTA	
11	AGT1	21	5161-7012	(TG) ₁₂	256	TATGTACGTGAAAGCTCGTGTG	AAATGGATCAGACAAAGAGGG	
12	AGT1	39	4226-5840	(TG) ₈	241	CTTCATGGGGTGTACAAATG	AAGGCGAAGAGCAGTCATGTC	
13	MAL31	556	4872-6578	(TCG) ₆	235	GTTGTCGGTAGACAGATGCAGA	TCTCAACGAGCAGAAACTCAA	
14	MAL31	556	4872-6578	(AACGAC) ₆	210	ACCATCATCACCATCAGGAAA	GAATCAGCGGGAGTATAGC	
15	MAL31	1203	1-395	(TA) ₆	200	CGCCTTGTGTTCTCTCTCT	CAAATGTTGTTCCCTACTTG	
16	MAL31	1203	1-395	(GT) ₁₃	194	AGGTCAATTCAACGCAATCG	TATTCGTACACACTCGGATCAC	
17	MAL31	1203	1-395	(TA) ₆ - 2	269	CGAGAAACTGGAATGGTAGAGG	CTACATATGGAAGACGGTGACAT	
18	MAL31	1203	1-395	(TA) ₇	194	AGCAATCTGGTAGTGTCCCTC	ACCGAGAACGAGCAAGTTAAA	
19	MET3	69	13016-14551	(AT) ₆	297	CGGTTGTGTTTAGATGCTGA	TACGGCACTGTTACCATTTGTT	
20	MET3	69	13016-14551	(AT) ₁₀	229	TGTTACGACAGAGAGAGCCA	CACACTGCACTCAACACCATAA	
21	MET3	255	39598-41133	(TA) ₁₁ - 2	282	CTTGCCTACGTTTCTGCTCT	GCATTGAACGACAGATTGATGT	
22	MET3	255	39598-41133	(TA) ₆ - 3	190	CCCAACCTACAAAGAAATCAGC	TGTGGAAACAGGAAAGGTACT	
23	MET3	686	5605-7140	(TA) ₆ - 4	190	TGTGGAAACAGGAAAGGTACT	CCCAACCTACAAAGAAATCAGC	
24	MET3	686	5605-7140	(TGC) ₇	179	TGAGGGAAATGGAGTGGGATAA	CTCCGATGAAGAACATCGGAAC	
25	MET14	199	24180-24788	(TTAT) ₆	188	GCTAGACAATAACGTGGGAGG	ACGGGGTTCACGGAAATCAAAG	
26	MET16	883	3055-3828	(TA) ₁₆	376	CTTGAGCGGGTCTTGCTCT	TAGGTTGGTGTGCTGAGTTAT	
27	MPH2	552	9466-11296	(ATT) ₆	258	GTAGAAGAGGGCTGCTACTTG	ATTGACTCACACAAACAGCTA	
28	MPH2	584	5901-7731	(GCA) ₇	265	AACTGGTTGATTTCTCCAAGA	CAGATCGCATAAGAAGGAGGTC	
29	MPH2	926	424-1938	(TA) ₆ - 5	141	ATATTTGGGTATAATGCTCG	TAGTGGTTGCTAAAACCTT	
30	SUL2	52	319316-321970	(TA) ₉	177	GTACTGCCCATGCAATGATA	CCTTTGGGATTGCTTTCTCT	
31	SUL2	92	24432-27113	(AT) ₇ + (GT) ₆	268	GAAACTAGCAACCTCGGATAGC	TGGATAACCTCCCTGGACATA	
32	SUL1	16	13411-15967	(ACA) ₁₃	295	AACCGTAAAGAGACACCCAAGA	GAGGTGGTGTGATTGCTGTGTT	
33	SUL1	16	13411-15967	(CCT) ₆	277	AACAACAACAACAAACAGCC	GTGATAGCATCCACTACTTGCG	
34	SUL1	16	13411-15967	(TAA) ₆	280	TGTACCTACTCCACCAACGCTA	AACTTCTCCCTGCCTT	
35	SUL1	555	10226-12805	(CAG) ₆	298	CGTAAATCAAGGCTCTCAAAGG	GCTGGTGTAAAGCGGGATAACTA	
36	SSU1	31	422146-423458	(CAA) ₈	200	CGGCAATGACAATAGTAAACGA	GAGAGGATGAACGGATGAAGG	
37	SSU1	31	422146-423458	(AG) ₁₂	275	GAAGCCTCGTGTGAGTATC	GTCGGAAGACTGATTCCGTT	

CENOVNO UGODNEJŠA REAKCIJA PCR

3.3.1.4 Priprava začetnih oligonukleotidov

Začetne oligonukleotide smo naročili pri podjetju Macrogen (Južna Koreja). Dobili smo jih v liofilizirani obliki, zato jih je bilo potrebno v prvi fazi rehidrirati z dodatkom vode PCR. Dodati je bilo potrebno toliko vode PCR, da je bila končna koncentracija začetnih oligonukleotidov $100 \text{ pmol}/\mu\text{L}$. Sledila je še redčitev do končne koncentracije $10 \mu\text{M}$, ki je potrebna za reakcije PCR. Začetne oligonukleotide, ki so označeni z fluorescentno oznako, smo zaščitili pred svetlobo.

3.3.1.5 Pomnoževanje mikrosatelitov

a) Metoda verižne reakcije s polimerazo s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi

Preglednica 5: Sestava mešanice za metodo verižne reakcije s polimerazo s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi

Sestavina	Končna koncentracija
Green GoTaq® Flexi Buffer	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,2 μM
Sprednji začetni oligonukleotid	0,5 μM
Zadnji začetni oligonukleotid	0,5 μM
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	0,5 U
Genomska DNA	100 ng
Voda PCR	do 20 μL

Pred uporabo smo vse reagente premešali. Polimerazo *Taq* smo ves čas hranili na ledu.

Reakcija PCR je potekala po protokolu, kot prikazuje preglednica 6.

Preglednica 6: Program za metodo verižne reakcije s polimerazo s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi

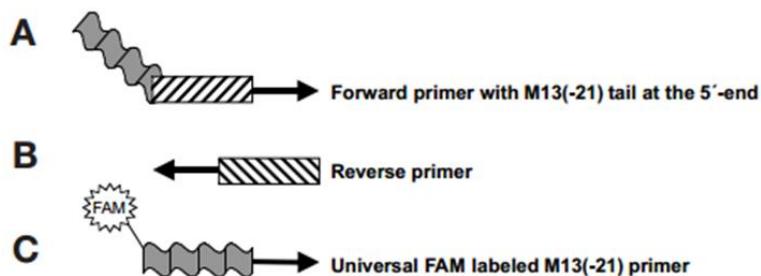
Korak	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	95	4 min	1
Denaturacija	95	30 s	34
Prileganje začetnih oligonukleotidov	56	30 s	
Podaljševanje verige	72	1 min	
Končno podaljševanje verige	72	7 min	1
Ohlajanje	4	∞	1

b) Cenovno ugodnejša reakcija PCR s fluorescentno označenim univerzalnim začetnim oligonukleotidom

Ker so fluorescentno označeni oligonukleotidi dragi, je Schuelke (2000) razvil bolj ekonomično metodo za fluorescentno označevanje PCR pomnožkov, ki smo jo poimenovali »cenovno ugodnejša reakcija PCR«.

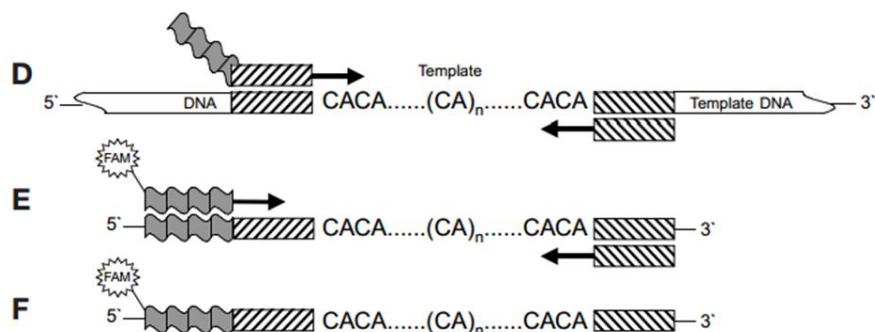
PCR fragmenti se fluorescentno označijo tekom reakcije PCR s pomočjo treh začetnih oligonukleotidov (Slika 16):

- Sprednji začetni oligonukleotid s komplementarno obrnjениm delom univerzalnega začetnega oligonukleotida M13(-21) na 5' koncu (A)
- Zadnji začetni oligonukleotid (B)
- Univerzalni fluorescentno (FAM) označen M13(-21) začetni oligonukleotid (C)



Slika 16: Začetni oligonukleotidi pri cenovno ugodnejši reakciji PCR (Schuelke, 2000)

Koncentracija sprednjega začetnega oligonukleotida mora biti za več kot pol manjša od zadnjega začetnega oligonukleotida. Tekom reakcije PCR so temperature v napravi PCR nastavljene tako, da se najprej na DNA vezeta sprednji začetni oligonukleotid s komplementarno obrnjениm delom univerzalnega začetnega oligonukleotida M13 in zadnji začetni oligonukleotid (D). Ko sta vezana, se temperatura zniža (53°C), in to omogoči vezavo univerzalnega začetnega oligonukleotida, ki nato prevzame vlogo sprednjega začetnega oligonukleotida (E). Novonastali produkt PCR na svojem 5' koncu vsebuje fluorescentno barvilo FAM (F).



Slika 17: Potek pomnoževanja pri cenovno ugodnejši reakciji PCR (Schuelke, 2000)

Preglednica 7: Sestava mešanice za cenovno ugodnejšo reakcijo PCR

Sestavina	Končna koncentracija
Green GoTaq® Flexi Buffer	1x
MgCl ₂	2 mM
dNTP	0,2 µM
Univerzalni začetni oligonukleotid	0,8 µM
Sprednji začetni oligonukleotid	0,2 µM
Zadnji začetni oligonukleotid	0,8 µM
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	0,5 U
Genomska DNA	100 ng
Voda PCR	do 20 µL

Pred uporabo smo vse reagente premešali. Polimerazo *Taq* smo ves čas hranili na ledu.

Reakcija PCR je potekala po protokolu, kot prikazuje preglednica 8.

Preglednica 8: Program za cenovno ugodnejšo reakcijo PCR

Korak	Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
Začetna denaturacija	94	5 min	1
Denaturacija	94	30 s	30
Prileganje začetnih oligonukleotidov	56	45 s	
Podaljševanje verige	72	45 s	
Denaturacija	95	30 s	8
Prileganje začetnih oligonukleotidov	53	45 s	
Podaljševanje verige	72	45 s	
Končno podaljševanje verige	72	7 min	1
Ohlajanje	4	∞	1

c) Metoda verižne reakcije s polimerazo z izboljšano eksonukleazno aktivnostjo

Uporabili smo DNA posameznih kolonij. Posamezne kolonije smo pridobili tako, da smo pivino redčili s sterilno destilirano vodo ter jo razmazali na plošče z YPD gojiščem. Plošče smo inkubirali na 28°C, 2 dni. Reakcijsko mešanico smo pripravili tako za reakcijo PCR s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi, kot cenovno ugodnejšo različico.

Preglednica 9: Sestava mešanice za metodo verižne reakcije s polimerazo z izboljšano eksonukleazno aktivnostjo

Sestavina	Končna koncentracija
FastStart High Fidelity Reaction Buffer z 1,8 mM MgCl ₂	10 %
dNTP	0,2 µM
Sprednji začetni oligonukleotid	0,4 µM
Zadnji začetni oligonukleotid	0,4 µM
FastStart High Fidelity Enzyme Blend	0,5 U
DMSO	0-10 %
Genomska DNA	100 ng
Voda PCR	do 20 µL

Preglednica 10: Sestava mešanice za cenovno ugodnejšo reakcijo PCR s polimerazo z izboljšano eksonukleazno aktivnostjo

Sestavina	Končna koncentracija
FastStart High Fidelity Reaction Buffer z 1,8 mM MgCl ₂	10 %
dNTP	0,2 µM
Univerzalni začetni oligonukleotid	0,8 µM
Sprednji začetni oligonukleotid	0,2 µM
Zadnji začetni oligonukleotid	0,8 µM
DMSO	0-10 %
FastStart High Fidelity Enzyme Blend	0,5 U
Genomska DNA	100 ng
Voda PCR	do 20 µL

3.3.1.6 Vizualizacija pomnožkov

a) Priprava gelov

Odvisno od števila vzorcev smo pripravili različno velike gele. Gele smo pripravljali dveh velikosti, in sicer 10 x 15 cm (volumen 60 mL) in 15 x 25 cm (volumen 180 mL). Pripravljali smo 2,5 % gele (2,5 g agaroze na 100 mL 1x pufera TAE). Raztopitev agaroze smo dosegli s segrevanjem v mikrovalovni pečici. Ko se je agarosa popolnoma raztoplila, smo steklenice z vsebino prestavili v vodno kopel (60 °C). V ohlajeno vsebino smo dodali barvilo SYBR® Safe DNA Gel Stain, in sicer 2 µL v 50 ml. Nato smo raztopljen gel vlili v nosilec za gel ter mu vstavili glavniček. Pri vlivanju smo pazili, da nismo vnesli preveč zračnih mehurčkov. Ko je bil gel strjen, smo mu odstranili glavniček ter ga do uporabe shranili v hladilniku.

b) Ločevanje pomnožkov PCR z elektroforezo

Gel smo vstavili v kadičko za elektroforezo ter nalili 1x pufer TAE. V luknjice v gelu smo nanesli pomnožke PCR, po 5 µl na luknjico. V luknjici na začetku ter na koncu smo nanesli še velikostni standard GeneRuler™, po 4 µl. Sledilo je ločevanje pod pogoji:

Srednji gel: 100 V, 400 mA, 30 min

Veliki gel: 140 V, 400 mA, 30 min

Po končanem ločevanju smo gel slikali z napravo GelDoc 2000 ter obdelali s programom Quantity One 4.2.3.

3.3.1.7 Natančna ugotovitev velikosti PCR pomnožkov

a) Priprava vzorcev

Da bi pridobili natančne velikosti PCR pomnožkov, smo naše vzorce poslali na analizo v Macrogen (Južna Koreja), kjer so natančne velikosti določili s kapilarno elektroforezo.

b) Obdelava rezultatov

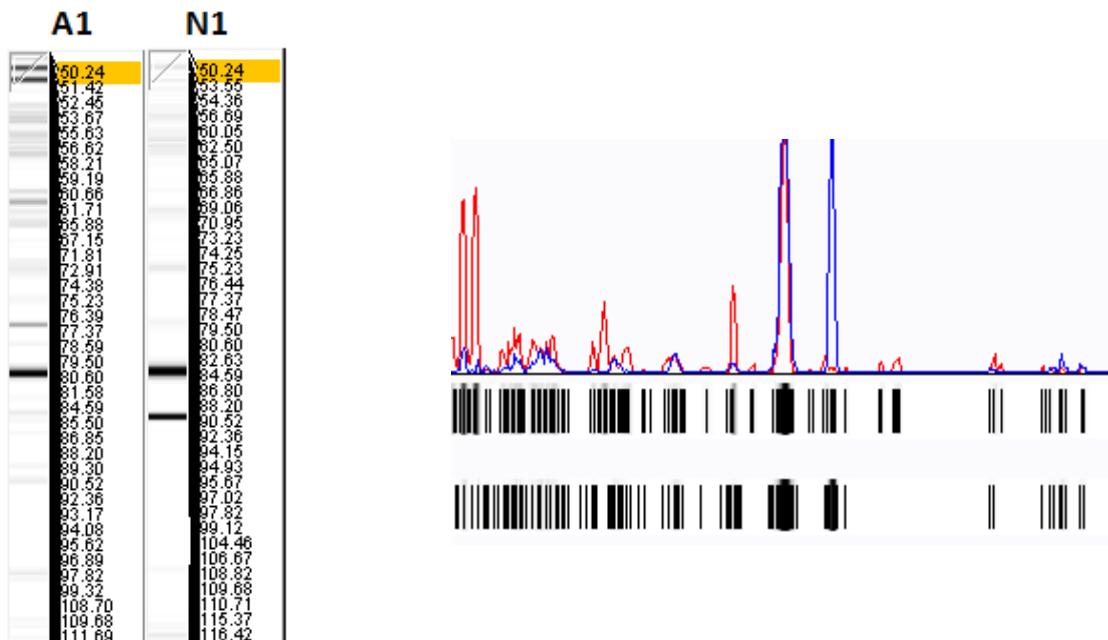
Rezultate smo obdelali s programom BioNumerics 7.1. V program smo vnesli rezultate analize, vnesli teoretične dolžine mikrosatelitov tako, da smo vpisali njihovo velikost (npr. če imamo mikrosatелit TA₁₁ je njegova velikost 22 baznih parov), vpisali velikost preostalega dela pomnoženega fragmenta (npr. če je celoten pomnožen fragment pri TA₁₁ velik 174 baznih parov, k temu prištejemo 18 baznih parov (univerzalni začetni oligonukleotid), temu odštejemo 22 (velikost mikrosatелita) in dobimo 170). Nato smo med sabo primerjali velikosti dobljenih fragmentov pri različnih zaporednih fermentacijah.

Program nam je rezultate prikazal v obliki kot prikazuje preglednica 11.

Preglednica 11: Oblika podajanja rezultatov s programom BioNumerics (A1 - mikrosatелit TA₁₁ pri fermentaciji A, N1 - mikrosatелit TA₁₁ pri fermentaciji N, številka 9 (levo zgoraj) - število ponovitev motivov znotraj mikrosatелita, številka 5603 (levo spodaj) – višina vrha, številka 187.13 (desno zgoraj) – določena velikost, številka 188 (desno spodaj) – pričakovana velikost glede na sekvenco mikrosatелita)

(TA) ₁₁		
A1	9	187,13
	5603	188
N1	18	206,87
	10576	206

Program nam je podal tudi slike gelov in elektroforegrame kot prikazuje slika 18.



Slika 18: Slike gelov in elektroforegram dobljeni s programom BioNumerics (A1 - mikrosatелit TA₁₁ pri fermentaciji A, N1 - mikrosatелit TA₁₁ pri fermentaciji N, Kromatogram: A1 - rdeče, N1 - modro)

3.3.2 Elektroforetska kariotipizacija

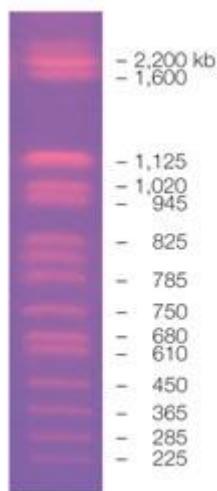
Elektroforetska kariotipizacija je bila izvedena s pomočjo metode, ki sta jo prva opisala Carle in Olson (1985), priredili pa Raspor in sod. (2000).

3.3.2.1 Izolacija DNA za kariotipizacijo

Izolacija DNA za kariotipizacijo je potekala tako, da smo k 1 mL sterilne destilirane vode dodali 100 μ L pivine (nekje 23×10^5 celic) ter dobro homogenizirali na vrtičniku. Centrifugirali smo pri 4000 obr/min, 5 minut ter odlili supernatant. K sedimentu smo dodali 1 mL 50 mM EDTA (pH=7.5), resuspendirali, centrifugirali pri 4000 obr/min, 5 minut, ter odlili supernatant. V posebni mikrocentrifugirki smo pripravili pufer CPES (1,5 mL CPESA + 1,5 mL 1M EDTA, (pH=7.5) in dodali še zrno DTT (ditiotreitol). V vsako mikrocentrifugirko smo k biomasi dodali po 75 μ L pripravljenega pufra CPES ter premešali na vrtinčniku. V 4,1 mL destilirane sterilne vode smo raztopili 55 mg LMP agaroze. Dobro razapljanje smo dosegli v mikrovalovni pečici. Nato smo raztopino inkubirali pri 42 °C ter dodali 16 mg Novo Zym 234. K predhodno obdelani biomasi smo v vsako mikrocentrifugirko dodali po 165 μ L LMP agaroza/Novo Zym raztopine ter to inkubirali pri cca. 42 °C, da smo preprečili strjevanje. Vsebino mikrocentrifugirke smo nato s pipeto dobro premešali ter napolnili kalupe. Kalup z blokci smo shranili za 20 min v hladilniku, da so se strdili. Pripravili smo si označene mikrocentrifugirke za shranjevanje blokcev, jih napolnili z 1 ml pufra CPE (40 mL pufra CPE = 20 mL CPEa + 20 mL 1M EDTA, pH= 7.5) in v njih shranili blokce. Inkubirali smo jih 1 h pri 30 °C, brez stresanja. Odstranili smo pufer CPE in blokce trikrat spirali (po 15 min) z 50 mM EDTA (pH = 9,0). Po zadnjem odlitju EDTA smo dali v mikrocentrifugirke po 1 mL RAZTOPINE 3 s proteinazo K. (Pripravili smo 40 mL RAZTOPINE 3 + 40 mg proteinaze). Blokce smo v raztopini s proteinazo inkubirali ob rahlem mešanju preko noči pri 50 °C. Odlili smo raztopino z encimom in blokce dali za 1h v 50 mM EDTA (pH=9,0). Odlili smo 50 mM EDTA in blokce shranili v 0,5 M EDTA (pH=9,0). Takšni blokci so stabilni eno leto pri 4 °C.

3.3.2.2 Pulzna elektroforeza za ločbo kromosomov kvasovk

Za pulzno elektroforezo je bilo potrebno najprej pripraviti nosilni gel. Pripravili smo ga tako, da smo 1,5 g agaroze raztopili v 135 mL destilirane vode in 15 mL 5x TBE pufru. Popolno raztopitev agaroze smo dosegli v mikrovalovni pečici. Nato smo agarozo ohladili na 50 °C, jo vlili v pripravljen okvir ter vstavili glavnicek. Ko se je gel strdil, smo v luknjice nanesli tanke rezine (1 mm) blokcev z izolirano DNA ter luknjice zalili z majhno količino gela. V prvo in zadnjo luknjico smo nanesli standard dolžin kromosomov vrste *S. cerevisiae* (CHEF DNA Size Marker).



Slika 19: Standard dolžin kromosomov vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad)

Ločba kromosomov je potekala v sistemu pulzne gelske elektroforeze CHEF DR-III z 2 L 0,5x TBE pufra.

Preglednica 12: Pogoji ločevanja pri pulzni gelski elektroforezi

Blok	Čas pulza	Čas ponavljanja pulza
1	100 s	1 h
2	90 s	8 h
3	60 s	15 h

Temperatura pufra: 12°C
Napetost: 5V/cm

Po ločevanju je sledilo barvanje gela (30 min) v barvilu Gel Red, ki smo ga pripravili tako, da smo zmešali 120 mL destilirane vode in 36 µL barvila. Gel smo slikali z dokumentacijskim sistemom GelDoc 2000 ter obdelali s programom Quantity One 4.2.3.

3.3.3 Izražanje genov

3.3.3.1 Priprava začetnih oligonukleotidov

Odločili smo se, da bomo analizirali izražanje gena MAL31, ki kodira maltozni transporter. Začetne oligonukleotide in hibridizacijsko sondu znotraj gena smo poiskali s pomočjo internetne aplikacije Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>).

Preglednica 13: Seznam začetnih oligonukleotidov in hibridizacijskih sond za qPCR

Gen	Začetni oligonukleotid	Zaporedje
MAL31 var. 1	Sprednji začetni oligonukleotid	CAGACACTCATGGCGTCAAA
	Zadnji začetni oligonukleotid	CAGACAAAATCCTCCCCAGA
	Hibridizacijska sonda	TCAGAGAAATGAATTGGGG
MAL31 var. 2	Sprednji začetni oligonukleotid	TCCCATCTTGAGTACGGTCC
	Zadnji začetni oligonukleotid	TCAAAGCTGTATGAGTGGC
	Hibridizacijska sonda	GCCAAAGAGGCAGATGAAAG
Transkripcijski elongacijski factor (TEF)	Sprednji začetni oligonukleotid	TCAGTGAATAACCCACCATTAGG
	Zadnji začetni oligonukleotid	GCCTTTCACTGTTGTCAACAG
	Hibridizacijska sonda	ATGAGACAAACTGTCGCTGTCGGTG

3.3.3.2 Izolacija RNA

Za izolacijo RNA iz pivine smo uporabili kompleta RNeasy Mini Kit in On-Column DNase I Digestion Set.

V 2 mL mikrocentrifugirko smo nasuli 0,8 g steklenih kroglic (premer 425-600 µm), ki smo jih predhodno suho sterilizirali pri 180 °C, 12 ur. Dodali smo 600 µL pufra RLT, ki smo mu predhodno dodali β-merkaptoetanol (1 mL RLT pufra + 10 µL β-merkaptoetanola), 100 µL kvasne biomase (nekje $23 \cdot 10^5$ celic) ter premešali. Nato smo vzorce homogenizirali s pomočjo naprave za razbijanje celic pri hitrosti 6,5 min. Sledilo je centrifugiranje 1 min pri 2000 obr/min pri 20 °C. V sveže mikrocentrifugirke smo prenesli 400 µL supernatanta in mu dodali 400 µL 70 % etanola ter premešali s pipetiranjem. 700 µL mešanice smo prenesli na kolono, ki je priložena kompletu. Centrifugirali smo 1 min pri 12000 obr/min pri 20 °C ter zavrgli tekočino, ki je prišla skozi kolono. Na kolono smo nanesli 350 µL pufra RW1, centrifugirali 1 min na 12000 obr/min pri 20 °C ter zavrgli tekočino, ki je prišla skozi kolono. Na kolono smo nanesli 80 µL DNaze I (neznana koncentracija) ter inkubirali 15 min pri sobni temperaturi. Na kolono smo nanesli 350 µL pufra RW1, centrifugirali 1 min pri 12000 obr/min pri 20 °C, dvakrat zaporedoma dodali 500 µL pufra RPE, centrifugirali 1 min pri 12000 obr/min pri 20 °C. Med vsakim korakom smo izpraznili zbiralno mikrocentrifugirko. Kolono smo prestavili na svežo 2 mL zbiralno mikrocentrifugirko ter centrifugirali 1 min pri maksimalni hitrosti pri 20 °C. Kolono smo prestavili v svežo 1,5 mL zbiralno mikrocentrifugirko, dodali 50 µL vode, ki ni vsebovala RNaz, inkubirali 2 min pri sobni temperaturi ter centrifugirali 1 min pri 12000 obr/min pri 20 °C. Izolirano RNA smo neposredno zamrznili pri -80 °C.

3.3.3.3 Merjenje koncentracije RNA

Koncentracijo RNA smo merili s pomočjo naprave Lambda Bio. Pri merjenju so bile pomembne nastavitev, kot so: pot žarka (10), faktor redčitve (50 pri nanosu do 2 µL) ter faktor biološke molekule (40 za RNA).

Nanašali smo po 1,5 µL ter vmes čistili z etanolom. Napravo smo na začetku umerili z 1,5 µL destilirane vode.

3.3.3.4 Ločevanje celokupne RNA z elektroforezo

Za preverjanje RNA na gelu smo si pripravili mali 1,5 % gel, dimenzijs 7 x 10 cm (volumen 45 mL).

Gel smo vstavili v kadičko za elektroforezo ter nalili 1x pufer TAE. V luknjice v gelu smo nanesli celokupno RNA, ki smo ji predhodno dodali RNA Gel Loading Dye, ki vsebuje barvila bromfenol modro, ksilen cianol in etidijev bromid ter denaturacijsko sredstvo formamid. K 8,5 µL RNA smo dodali 8,5 µL barvila. Na gel smo nanesli po 8 µL v vsako luknjico. V luknjici na začetku ter na koncu smo nanesli še velikostni standard GeneRuler™, po 4 µL. Sledilo je ločevanje pod pogojih: 80 V, 400 mA, 30 min.

Po končanem ločevanju smo gel slikali z dokumentacijskim sistemom GelDoc 2000 ter obdelali s programom Quantity One 4.2.3.

3.3.3.5 Sinteza cDNA

Za sintezo cDNA smo uporabili komplet SuperScript VILO. Za en vzorec smo dodali 4 µL 5x VILO Reaction Mix, 2 µL SuperScript Enzyme Mix, ter toliko RNA, da je bila končna koncentracija RNA 2,5 µg v 20 µL reakcijske mešanice. Do 20 µL smo dopolnili z vodo DEPC. Primer: Če je bila začetna koncentracija RNA 465 µg/mL, smo dodali 5,5 µL RNA in 8,5 µL vode DEPC. VILO reakcijska mešanica vsebuje začetne oligonukleotide, ki se naključno prilegajo po celotnem transkriptu.

Preglednica 14: Protokol za sintezo cDNA

Temperatura (°C)	Čas (min)
25	10
42	60
85	5
4	∞

3.3.3.6 Priprava redčitev cDNA

Za nadaljnjo uporabo smo si pripravili serijo redčitev cDNA. Pripravili smo si petkratno redčitev, tako da smo k 16 µL vode PCR dodali 4 µL cDNA. Med pripravo redčitev smo vzorce dobro mešali.

3.3.3.7 Kvantitativni PCR

Preglednica 15: Sestava mešanice za qPCR

Sestavina	Končna koncentracija
Express qPCR mix	50 %
Sprednji začetni oligonukleotid	600 nM
Zadnji začetni oligonukleotid	600 nM
Hibridizacijska sonda	125 nM
Barvilo ROX	50 nM
Genomska DNA	12,5 %
Voda PCR	do 25 µL

Zaradi barvila ROX in fluorescentno označene hibridizacijske sonde smo imeli vzorce ves čas zaščitene pred svetlobo. Vzorce smo nanesli na 96 mikrotitrsko ploščo, jo pokrili z za to predvideno folijo ter centrifugirali. Ploščice smo pripravili za oba para genov in transkripcijski elongacijski faktor (Tef). Na ploščici smo naredili tri ponovitve redčitev. Ploščice smo pripravili v eni ponovitvi. Reakcija PCR je tako za preučevane vzorce kot transkripcijski elongacijski faktor potekala po protokolu, kot prikazuje preglednica 16

Preglednica 16: Program za qPCR

Temperatura (°C)	Čas	Število ciklov
50	2 min	1
95	2 min	1
95	15 s	
60	1 min	40

3.3.3.8 Obdelava rezultatov

Obdelava rezultatov je potekala s pomočjo programa qBase⁺ in metode delta-delta Cq. Program je zelo preprost, saj vanj le vnesemo dobljene vrednosti Cq in mu določimo število kopij DNA. Izriše nam umeritvene krivulje ter poda stolpčni graf, ki prikazuje relativno izražanje genov.

Dodatno smo rezultate obdelali še s pomočjo umerivenih krivulj. Za izris umerivenih krivulj smo uporabili vrednosti Cq pridobljene iz združenega vzorca vseh zaporednih fermentacij. Iz analize smo izločili vrednosti, ki odstopajo. Po izrisu umeritvene krivulje smo določili še naklon, presečišče, obratni naklon in obratno presečišče. Te vrednosti smo uporabili pri izračunu relativnega izražanja tarčnega gena. Nato smo izločili odstopajoče vrednosti Cq pri tarčnem in referenčnem genu, določili virtualno število kopij ter logaritem

virtualnega števila kopij. Najprej smo obdelali rezultate izražanja referenčnega gena. Vrednosti Cq smo pomnožili z obratnim naklonom umeritvene krivulje tarčnega gena in prišteli obratno presečišče tarčnega gena. To vrednost smo nato antilogaritmirali, naredili povprečje ponovitev ter upoštevali začetno redčitev vzorca in tako pridobili končno število kopij. Nato smo obdelali še rezultate tarčnega gena. Postopek je podoben, le da smo vrednosti Cq pomnožili z obratnim naklonom umeritvene krivulje referenčnega gena in prišteli obratno presečišče referenčnega gena. Na koncu smo število kopij tarčnega gena delili z končnim številom referenčnega gena in tako končno število kopij tarčnega gena normalizirali na referenčni gen. Na koncu smo dobljeno številko še logaritmirali in dobili smo relativno izražanje gena v posamezni zaporedni uporabi kvasa.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 MIKROSATELITI

4.1.1 Izbera mikrosatelitov in začetnih oligonukleotidov

S pomočjo programa WebSat smo v genomu *S. pastorianus* našli 1424 mikrosatelitov, ki vsebujejo vsaj 6 ponovitev po dve bazi.

Ker se v genomu *S. pastorianus* nahaja veliko število mikrosatelitov, smo se odločili, da v nadaljnji analizi uporabimo le mikrosatelite v bližini genov, ki kodirajo tehnološko pomembne lastnosti kvasovke. To so geni za α -glikozidne transporterje, sulfat permeaze, ATP sulfurlaze, adenil sulfat kinaze, 3'-fosfoadenilsulfat reduktaze in plazemske membranske sulfitne črpalke (Nakao in sod., 2009). S pomočjo programa BLAST smo določili mesto nahajanja omenjenih genov. Preglednica 17 prikazuje, na katerem kromosomu in kontigu se gen nahaja ter kakšna je njegova velikost.

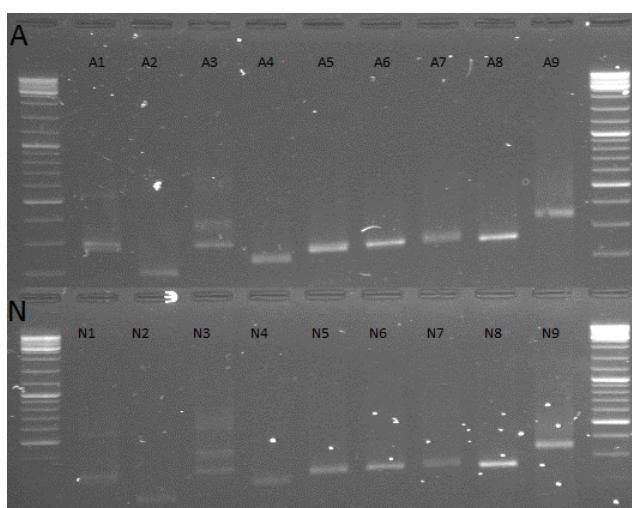
Preglednica 17: Identiteta genov

Gen	Sistematično ime	Kromosom	Velikost gena (bp)	Številka kontiga
AGT1 (MAL11)	YGR289C	7	1851	21
				39
MAL31	YBR298C	2	1845	50
				412
				556
				1091
				1203
				69
MET3	YJR010W	10	1536	255
				686
				46
MET14	YKL001C	11	609	199
MET16	YPR167C	16	786	883
MPH2	YDL247W	4	1830	552
				584
				926
SUL2	YLR092W	12	2682	52
				92
SUL1	YBR294W	2	2580	16
				555
SSU1	YPL092W	16	1377	31
				257

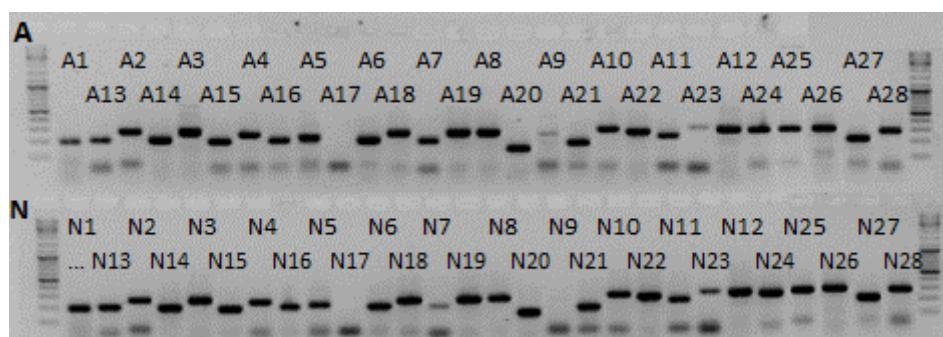
Glede na lokacijo genov v genomu smo izbrali odseke genoma, v velikosti okoli 20.000 bp ali izjemoma 40.000 bp, kjer smo poiskali mikrosatelite. V bližini omenjenih genov smo določili 37 mikrosatelitov. V bližini genov na nekaterih kontigih nismo našli nobenega mikrosatelita. Preglednica 4 prikazuje mikrosatelite v bližini omenjenih genov in izbrane začetne oligonukleotide za pomnoževanje mikrosatelitskih odsekov.

4.1.2 Primerjalna analiza prve in štirinajste zaporedne uporabe

Z reakcijo PCR smo mikrosatelite pomnožili ter jih ločili na gelu z gelsko elektroforezo. Slika 20 prikazuje mikrosatelite, kjer so uporabljeni fluorescentno označeni začetni oligonukleotidi. Slika 21 prikazuje mikrosatelite, kjer se začetni oligonukleotidi označijo posredno z univerzalnim začetnim oligonukleotidom med reakcijo PCR.



Slika 20: Slika gela pomnoženih fragmentov s klasično reakcijo PCR (A-prva in N-štirinajsta zaporedna uporaba)



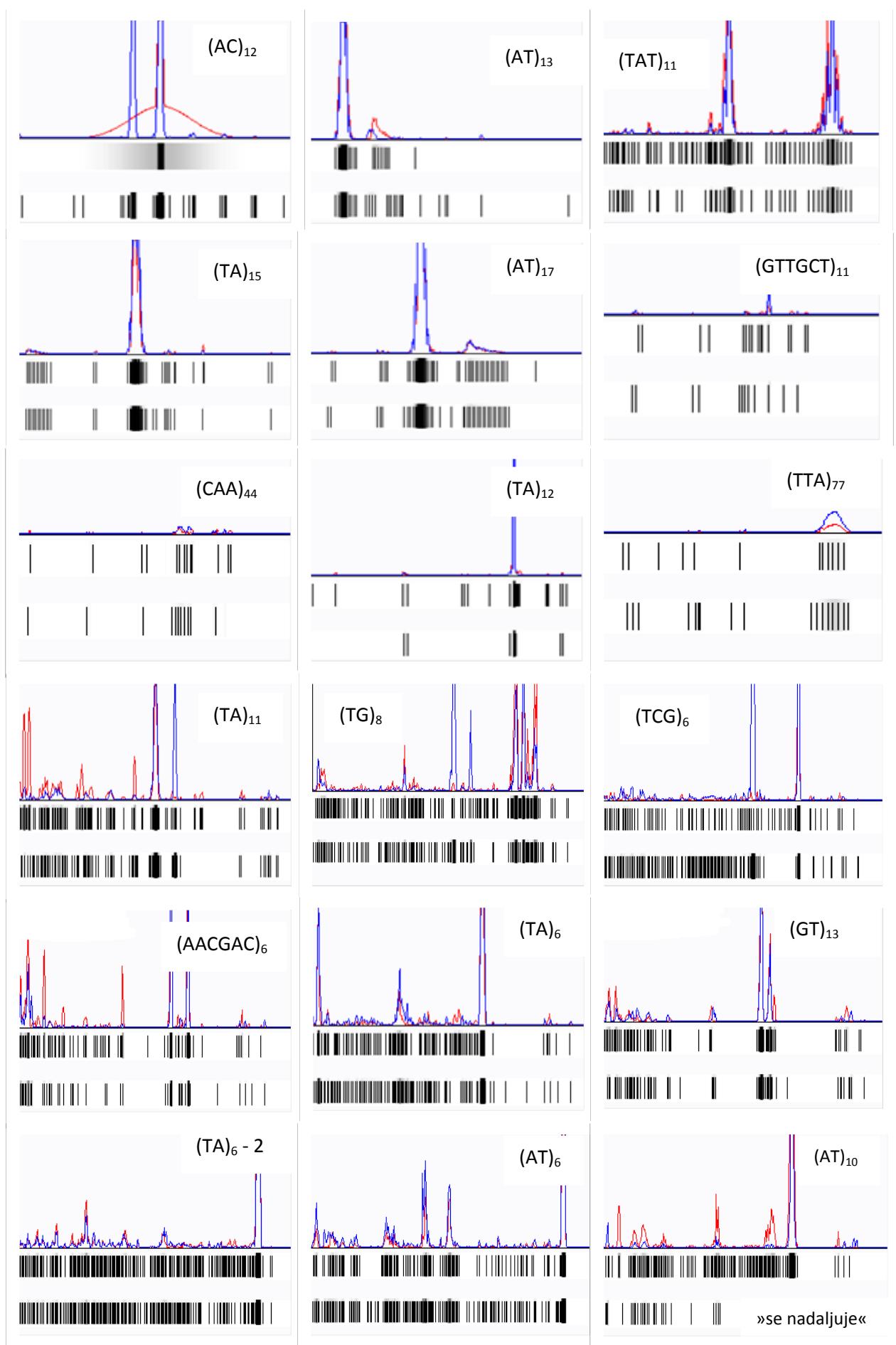
Slika 21: Slika gela pomnoženih fragmentov s cenovno ugodnejšo reakcijo PCR (A-prva in N-štirinajsta zaporedna uporaba)

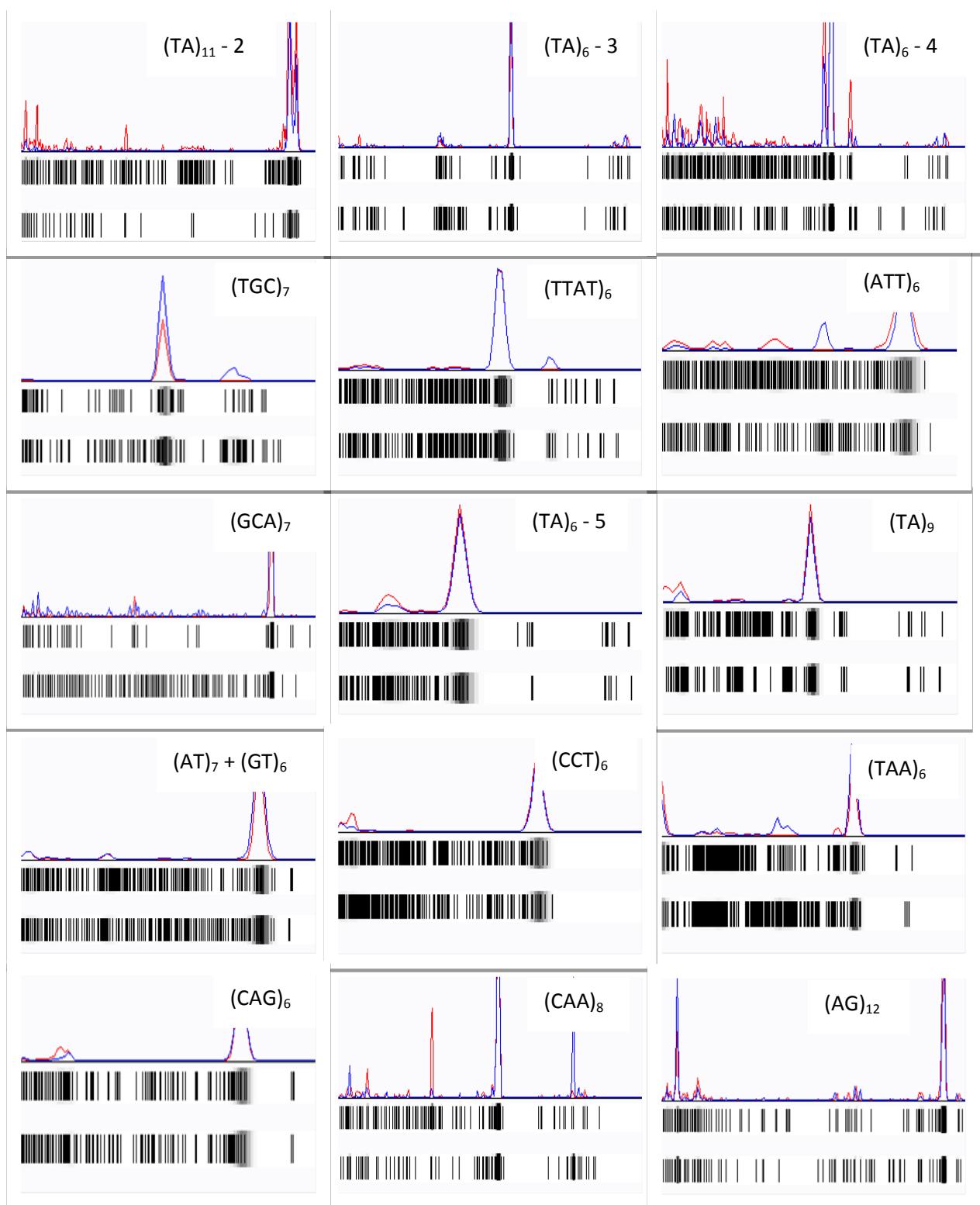
Na podlagi dobljenih slik gelov zaradi slabe ločljivosti gelske elektroforeze ne moremo govoriti o spremembah v številu ponovitev mikrosatelitskih ponovitev med prvo in štirinajsto zaporedno fermentacijo. V tej fazi smo lahko le potrdili primernost izbranih začetnih oligonukleotidov in uspešnost pomnožitve mikrosatelita.

V tej fazi smo iz analize izključili začetne oligonukleotide pod zaporednimi številkami 9, 17 in 23 za mikrosatelite $(TA)_7$, $(TA)_{16}$ in $(ACA)_{13}$ (Slika 21). Tudi po več poskusih in optimizaciji nismo dobili pravega fragmenta, glede na velikost mikrosatelita v sekvenciranem genomu *S. pastorianus*, ki smo jih pridobili s pomočjo programa WebSat.

Glej preglednico 4. Poskusili smo tudi z gradientno reakcijo PCR, kjer smo spremenjali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov. V nadaljnji analizi smo obravnavali le preostalih 34 mikrosatelitov.

Da bi dobili natančne dolžine mikrosatelitov, smo pomnožke PCR poslali v analizo v podjetje Macrogen (Južna Koreja). Tam so pomnožke ločili s kapilarno elektroforezo, ki je bolj občutljiva in ima večjo ločljivost v primerjavi z gelsko elektroforezo. Dobili smo elektroferograme (Slika 22) in natančne dolžine pomnožkov PCR (Preglednica 18). Prikazane so le vrednosti z najvišjimi vrhovi intenzitete pomnožkov PCR.





Slika 22: Elektroforegrami mikrosatelitov prve (rdeča barva) in štirinajstje (modra barva) zaporedne uporabe kvasovk

Elektroferogrami prikazujejo rezultate mikrosatelitov prve (rdeča barva) in štirinajste (modra barva) zaporedne uporabe kvasovk. Že na prvi pogled lahko vidimo, da pride do sprememb v določenih mikrosatelitskih regijah med zaporednimi uporabami.

Preglednica 18: Natančne dolžine pomnožkov PCR in število ponovitev znotraj mikrosatelita

Št.	Mikrosatelit	Prva zaporedna fermentacija		Štirinajsta zaporedna fermentacija	
		Dolžina mikrosatelita (bp)	Število ponovitev	Dolžina mikrosatelita (bp)	Število ponovitev
1	(AC) ₁₂	287	10	269	1
2	(AT) ₁₃	192	13	192	13
3	(TAT) ₁₁	300	12	300	12
4	(TA) ₁₅	230	13	230	13
5	(AT) ₁₇	264	16	264	16
6	(GTTGCT) ₁₁	267	10	261	9
7	(CAA) ₄₄	261	46	261	46
8	(TA) ₁₂	262	12	262	12
9	(TTA) ₇₇	232	36	235	37
10	(TA) ₁₁	188	9	206	18
11	(TG) ₁₂	276	13	276	13
12	(TG) ₈	269	13	269	13
13	(TCG) ₆	256	7	256	7
14	(AACGAC) ₆	216	4	222	5
15	(TA) ₆	216	5	216	5
16	(GT) ₁₃	204	9	204	9
17	(TA) ₆ - 2	287	6	287	6
18	(AT) ₆	315	6	315	6
19	(AT) ₁₀	245	9	245	9
20	(TA) ₁₁ - 2	294	8	294	8
21	(TA) ₆ - 3	206	5	206	5
22	(TA) ₆ - 4	208	6	208	6
23	(TGC) ₇	197	7	197	7
24	(TTAT) ₆	206	6	206	6
25	(ATT) ₆	279	7	279	7
26	(GCA) ₇	280	6	280	6
27	(TA) ₆ - 5	157	5	157	5
28	(TA) ₉	193	8	193	8
29	(AT) ₇ + (GT) ₆	286	13	286	13
30	(CCT) ₆	292	5	292	5
31	(TAA) ₆	298	6	298	6
32	(CAG) ₆	313	5	313	5
33	(CAA) ₈	212	6	212	6
34	(AG) ₁₂	289	10	289	10

Preglednica 18 prikazuje natančne dolžine pomnožkov PCR in število ponovitev znotraj mikrosatelita. Prikazane so le vrednosti z najvišjimi vrhovi intenzitete pomnožkov PCR.

Do sprememb v številu ponovitev je prišlo pri mikrosatelitih (AC)₁₂, (GTTGCT)₁₁, (TTA)₇₇, (TA)₁₁ in (AACGAC)₆.

Mikrosatelit (AC_{12}) je tekom štirinajstih zaporednih uporab starter kulture kvasa izgubil 9 ponovitev znotraj mikrosatelita. Od začetnih 10 ponovitev mu je po štirinajstih zaporednih uporabah ostala le ena ponovitev. Mikrosatelit (TA_{11}) pa je 9 ponovitev pridobil. Na začetku je mikrosatelit sestavljal 9 ponovitev, v štirinajstih zaporednih uporabah pa se mu je to število podvojilo na 18. V ostalih primerih je šlo le za spremembo v eni ponovitvi mikrosatelita. Mikrosatelit ($GTTGCT_{11}$) je imel na začetku 10 ponovitev, na koncu pa 9. Mikrosatelit (TTA_{77}) je imel na začetku 36 ponovitev, na koncu pa 37. Mikrosatelit ($AACGAC_6$) je imel na začetku 4 ponovitve, na koncu pa 5. Omeniti je potrebno da smo v analizi upoštevali le vrhove z najvišjo intenziteto.

Skupno smo v začetni fazi testirali 37 mikrosatelitov. Že s pomočjo gelske elektroforeze smo iz analize izključili tri mikrosatelite. To so mikrosateliti (TA_7), (TA_{16}) in (ACA_{13}), za katere se začetni oligonukleotidi niso izkazali kot pravilni. Tako nam je za nadaljnjo analizo ostalo 34 mikrosatelitov. Spremembe smo zaznali le pri 5 mikrosatelitih, kar znaša 14,7 %. Glede na ta podatek lahko zaključimo, da so mikrosateliti v večini tekom zaporedne uporabe stabilni.

Mikrosatelita (AC_{12}) in (TA_{11}) se nahajata v bližini gena za visokoafinitetni maltozni transporter ($AGT1$), mikrosatelit ($AACGAC_6$) se nahaja v bližini gena za maltozno permeazo ($MAL31$), mikrosatelit ($GTTGCT_{11}$) pa se nahaja v bližini gena za visokoafinitetno sulfatno permeazo ($SUL2$). Mikrosatelit (TTA_{77}) se ne nahaja v bližini nobenega tehnološko pomembnega gena, vendar smo ga za analizo izbrali zaradi njegove zanimive sestave. Sestavlja ga 77 enakih ponovitev, kar predstavlja zelo nestabilno območje, kjer bi tekom zaporedne uporabe kvasovk lahko prišlo do sprememb.

Do največ sprememb v številu ponovitev mikrosatelitskih zaporedij je prišlo v bližini genov za transport maltoze in maltotrioze. To sta gena za maltozno permeazo ($MAL31$) in visokoafinitetni maltozni transporter ($AGT1$). V bližini gena za maltozno permeazo smo testirali 6 mikrosatelitov in le pri enem je prišlo do sprememb (16,6 %). V bližini gena za visokoafinitetni maltozni transporter pa smo testirali 4 mikrosatelite, do sprememb pa je prišlo pri dveh izmed teh (50 %). Od 5 mikrosatelitov, pri katerih smo spremembe zaznali, se trije nahajajo v bližini genov za transport maltoze in maltotrioze (60 %).

Do sprememb je prišlo tudi v bližini gena, povezanega s sintezo sulfita. To je gen za visokoafinitetno sulfatno permeazo ($SUL2$). V bližini gena za visokoafinitetno sulfatno permeazo smo analizirali 3 mikrosatelite. Do sprememb je prišlo pri enemu od teh (33,3 %). Od 5 mikrosatelitov, pri katerih smo spremembe zaznali, se le eden nahaja v bližini genov povezanih s sintezo sulfita (20 %).

V večini primerov je do sprememb prišlo v bližini genov, ki so odgovorni za transport maltoze in maltotrioze ali sulfata iz okolice v celico.

4.1.3 Primerjalna analiza vseh zaporednih uporab

Običajna praksa v pivovarnah je, da kvasovke zaporedoma uporabijo 8 do 15 – krat. Kako dolgo se neka kultura lahko uporablja, je odvisno od več dejavnikov. To so sama genetska narava seva, kakovost pobrane kvasne biomase, možnost okužbe, slabitev fermentacijskih sposobnosti, spremembe v kemični sestavi končnega produkta in nadzor v podjetju. (Deželak in sod., 2014).

Da bi ugotovili, pri kateri zaporedni uporabi so se začele spremembe dogajati, smo za mikrosatelite (AC)₁₂, (GTTGCT)₁₁, (TA)₁₁ ponovili poskus za vse zaporedne uporabe kvasovk.

Rezultati so pokazali, da s pomnožitvijo mikrosatelitev ne dobimo le enega fragmenta ampak več. Ti fragmenti se razlikujejo v številu ponovitev osnovne enote mikrosatelite. Fragmenti se razlikujejo tudi po intenziteti. Kapilarna elektroforeza zaradi svoje visoke občutljivosti zazna tudi pomnožke PCR z manjšo intenziteto.

Za mikrosatelit (TA)₁₁ smo določili največ različnih dolžin mikrosatelitev, ki pa tekom zaporedne uporabe nihajo. V prvi zaporedni uporabi smo določili 12 različnih dolžin mikrosatelitev, prevladuje pa dolžina, ki vsebuje 9 ponovitev znotraj mikrosatelite. Tekom zaporedne uporabe pa se število mikrosatelitev različnih dolžin zmanjšuje. Pri petnajsti zaporedni uporabi smo določili le 7 različnih dolžin tega mikrosatelitev, prevladuje pa mikrosatelit z 18 ponovitvami. Za mikrosatelit (AC)₁₂ smo pri prvi zaporedni uporabi določili 6 različnih dolžin mikrosatelitev, med katerimi je prevladovala tista z desetimi ponovitvami, pri petnajsti zaporedni uporabi pa smo določili le dve, kjer je prevladovala tista z eno ponovitvijo. Za mikrosatelit (GTTGCT)₁₁ smo v prvi zaporedni uporabi določili 6 različnih dolžin mikrosatelitev, kjer prevladuje dolžina z 10 ponovitvami, v petnajsti zaporedni uporabi pa smo določili tri različne dolžine, kjer prevladuje tista z 9 ponovitvami.

(TA)11		Zaporedna uporaba					
Št. ponovitev motiva		1.	4.	12.	13.	14.	15.
1							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
15							
16							
17							
18							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
34							
36							
37							
38							

(AC)12		Zaporedna uporaba					
Št. ponovitev motiva		1.	4.	12.	13.	14.	15.
1							
2							
3							
4							
5							
10							
35							
36							
37							
38							

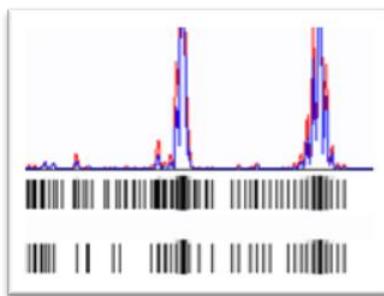
(GTTGCT)11		Zaporedna uporaba					
Št. ponovitev motiva		1.	4.	12.	13.	14.	15.
1							
2							
3							
5							
9							
10							
13							
19							

Slika 23: Pojavnost različnih fragmentov z različnim številom ponovitev pri zaporedni uporabi kvasa

V vseh primerih število različnih dolžin mikrosatelitov tekom zaporedne uporabe upada.

Morebitni razlog dobljenih rezultatov je genetsko heterogena sestava kvasne biomase. Domnevali smo, da je v nekem trenutku prevladovala biomasa z določenim številom ponovitev osnovne enote mikrosatelita, spet v drugem trenutku pa ima kompetitivno prednost biomasa s popolnoma drugim številom ponovitev osnovne enote mikrosatelita. Na splošno je heterogenost lahko na začetku visoka, nato pa po nekaj zaporednih uporabah upade. O heterogenosti kvasne biomase v svoji objavi govorita tudi Powell in Diacetus (2007). Do največ genetskih sprememb pri kvasovkah pride med propagacijo, ker se takrat celice najintenzivneje delijo.

Drugi možen razlog dobljenih rezultatov je zdrs polimeraze *Taq* med pomnoževanjem s PCR in posledično nepravilno parjenje vijačnice med sintezo DNA. Če zanka nastane v prepisani verigi, pride do nastanka večjega števila ponovitev, če pa se zanka pojavi v matrični verigi, nastane manjše število ponovitev. Mikrosateliti so še toliko bolj podvrženi napakam polimeraze, zaradi njihove značilne strukture (več ponovitev osnovne enote mikrosatelita) (Schlötterer in Harr, 2004). Posledica zdrsov je nastanek »stutter« profilov, kjer se vrhovi razlikujejo v eni ponovitvi. Vsak naslednji vrh ima nižjo intenziteto. Ti profili se pogosteje pojavljajo pri mikrosatelitih z daljšo osnovno enoto (Shinde in sod., 2003). Ta pojav se lepo vidi pri mikrosatelitu (TAT)₁₁.

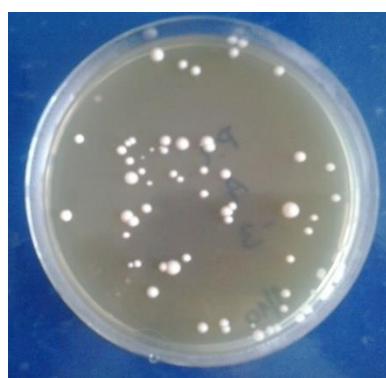


Slika 24: »Stutter« profil pri mikrosatelitu (TAT)₁₁

Tretji morebiten razlog dobljenih rezultatov je nespecifična vezava začetnih oligonukleotidov tekom pomnoževanja. Za vse začetne oligonukleotide bi bilo potrebno s pomočjo programa BLAST preveriti, če se mogoče vežejo na več različnih mest v genomu.

4.1.4 Primerjalna analiza treh zaporednih uporab na DNA posameznih kolonij

Da bi razjasnili dobljene rezultate, smo iz biomase zaporednih fermentacij pripravili redčitve do posameznih kolonij. Uporabili smo biomaso prve, dvanajste in petnajste zaporedne uporabe. Izbrali smo po štiri kolonije za vsako zaporedno uporabo. Iz teh kolonij smo izolirali DNA in opravili analize posameznih mikrosatelitov. Izbrali smo mikrosatelite, ki so se nam zdeli zanimivi zaradi njihove strukture. Ali vsebujejo veliko ponovitev osnovne enote ali pa je sama osnovna enota dolga. To so mikrosateliti $(TG)_8$, $(TCG)_6$, $(AACGAC)_6$, $(AG)_{12}$ in $(TTA)_{77}$. Na žalost nismo preverili mikrosatelitov, za katere smo ugotovili da imajo različno število ponovitev znotraj mikrosatelita $((AC)_{12})$, $(GTTGCT)_{11}$, $(TA)_{11}$ in $(AACGAC)_6$.



Slika 25: Posamezne kolonije prve zaporedne uporabe

Kolonije so se razlikovale že po velikosti, od čisto majhnih do zelo velikih. V analizi smo uporabili tako majhne kot tudi velike kolonije, da bi videli, če ima to kakšno povezavo s številom ponovitev mikrosatelitov (da se pojavljajo različni fragmenti različnih dolžin).

Uporabili smo tudi bolj specifično polimerazo (FastStart High Fidelity PCR System) za pomnoževanje mikrosatelitov, da bi se izognili morebitnim napakam polimeraze. Gre za novo encimsko mešanico kemično modificirane DNA polimeraze *Taq* in termostabilnega proteina, ki preverja napake. Ta encimska mešanica je neaktivna pri temperaturah nižjih od 75 °C in onemogoča nespecifično vezavo nukleotidov (www.roche-applied-science.com).

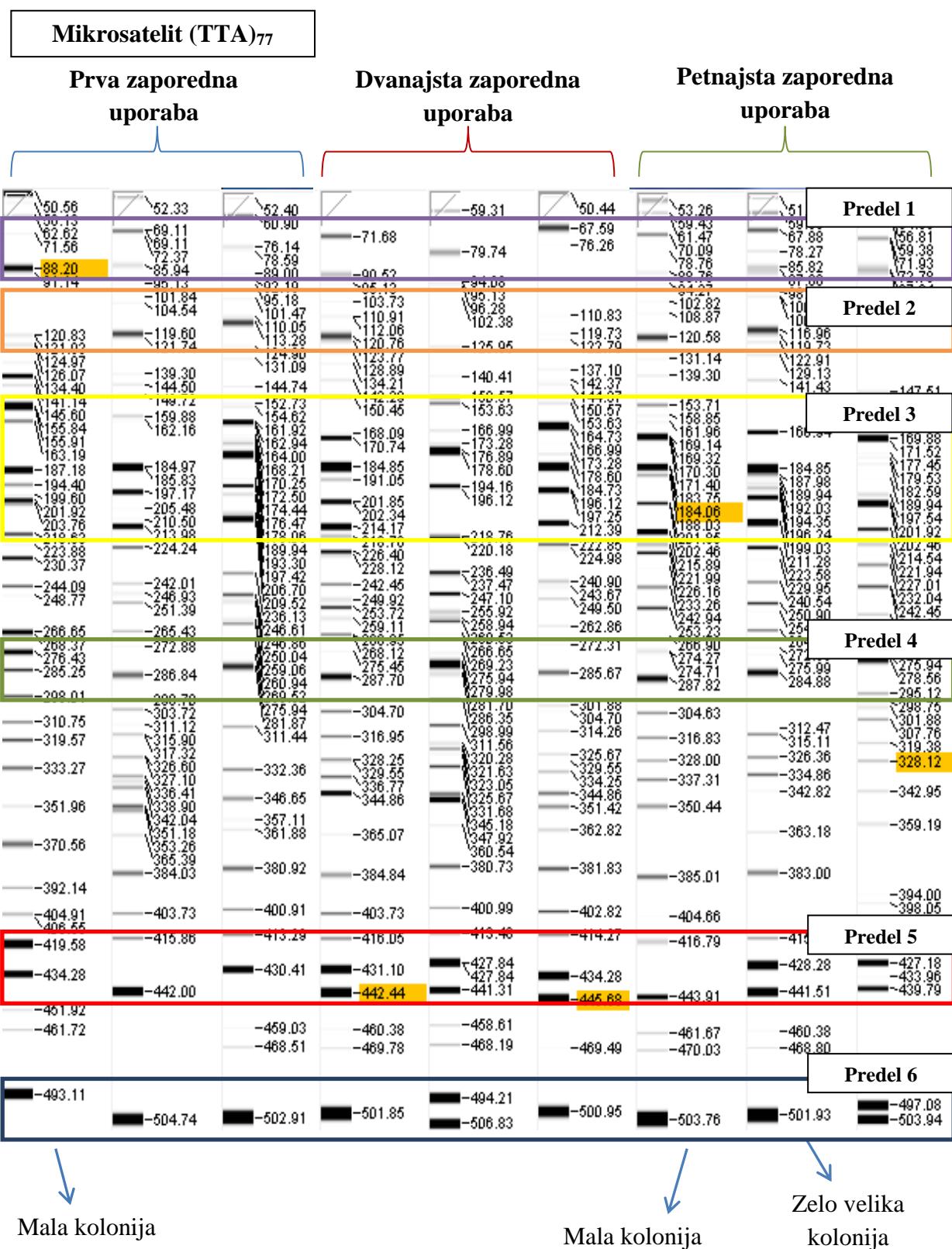
Rezultati so pokazali, da je celokupna biomasa odvzeta neposredno iz fermentorja dejansko genetsko heterogena. Posamezne kolonije vsebujejo mikrosatelite z različnim številom ponovitev. Pri eni koloniji prevladuje mikrosatelit z nekim številom ponovitev, pri drugi pa se to število spremeni. Preglednica 19 prikazuje dolžine pomnožkov in število ponovitev znotraj mikrosatelita. Predstavljeni so le fragmenti z najvišjo intenziteto.

Preglednica 19: Natančne dolžine pomnožkov PCR in število ponovitev znotraj mikrosatelita pri analizi posameznih kolonij

Kolonija	Prva zaporedna uporaba		Dvanajsta zaporedna uporaba		Petnajsta zaporedna uporaba	
	Dolžina (bp)	Število ponovitev	Dolžina (bp)	Število ponovitev	Dolžina (bp)	Število ponovitev
(TTA)₇₇						
1	421	99	214	30	184	20
2	214	30	178	18	187	21
3	211	29	166	14	211	29
4	184	20	208	28	217	31
(AG)₁₂						
1	333	32	425	78	313	22
2	337	34	425	78	427	79
3	313	22	325	28	403	67
4	311	21	435	83	289	10
(AACGAC)₆						
1	210	3	204	2	270	13
2	264	12	294	17	270	13
3	264	12	210	3	204	2
4	264	12	258	11	210	3
(TG)₈						
1	263	10	261	9	261	9
2	263	10	261	9	261	9
3	261	9	261	9	261	9
4	261	9	261	9	261	9
(TCG)₆						
1	253	6	256	7	256	7
2	253	6	253	6	253	6
3	256	7	256	7	253	6
4	256	7	253	6	253	6

Pri mikrosatelitu (TTA)₇₇ smo zaznali največjo heterogenost med različnimi kolonijami. Znotraj ene zaporedne fermentacije so vse preučevane kolonije genetsko različne. Izstopa prva kolonija prve zaporedne fermentacije, kjer je dolžina dobljenega mikrosatelita kar 1,2-krat večja od pričakovane (355 bp). Tudi pri mikrosatelitih (AG)₁₂ in (AACGAC)₆ smo zaznali veliko heterogenost. Večina kolonij je bila genetsko različnih. Le po dve koloniji sta bili enaki. Pri mikrosatelitih (TG)₈ in (TCG)₆ pa smo zaznali nizko heterogenost. Tekom vseh zaporednih uporab smo določili le po dve genetsko različni koloniji.

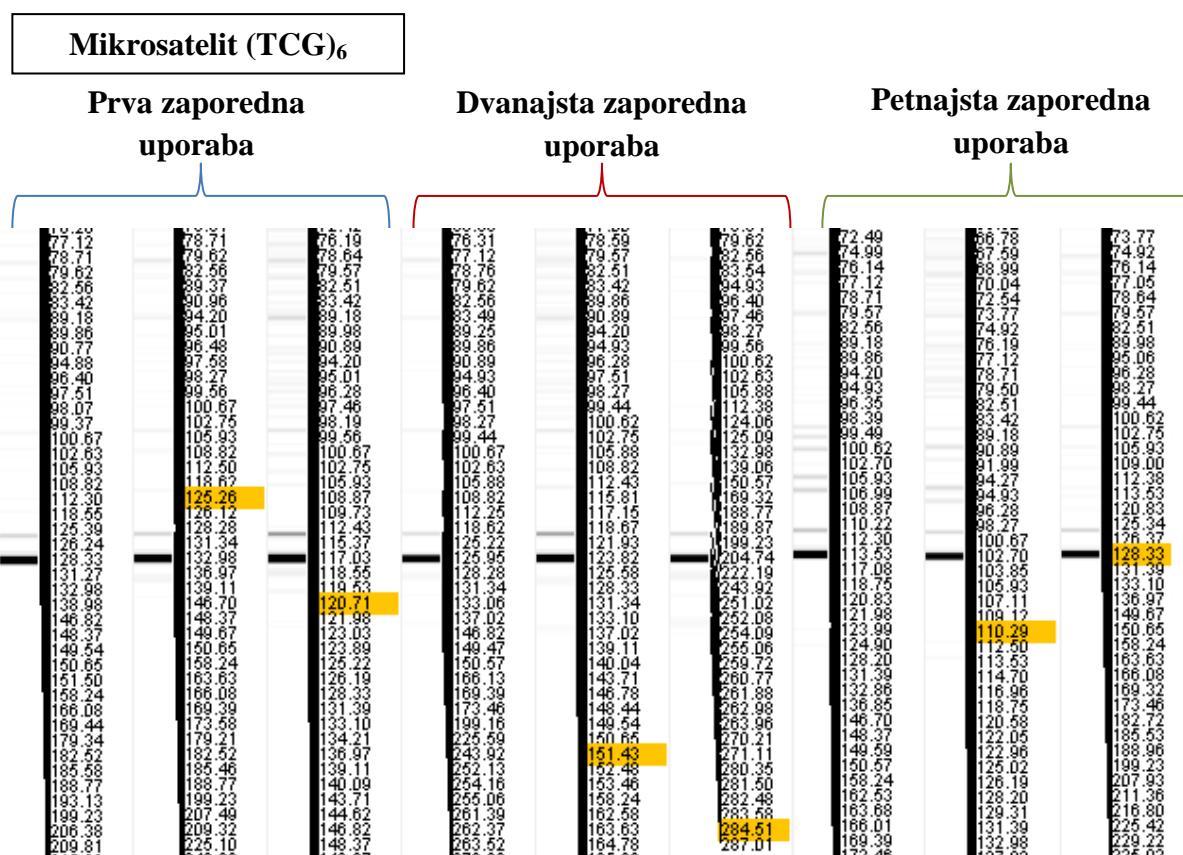
Slika 26 prikazuje elektroferograme mikrosatelita (TTA)₇₇ pri prvi, dvanajsti in petnajsti zaporedni uporabi. Glede na pojavnost fragmentov smo določili območja, kjer so spremembe med kolonijami in zaporednimi uporabami očitnejše. Najočitnejše spremembe je mogoče opaziti v predelu 5 in 6. Tu se pri posameznih kolonijah, v neki fazи, na območju določenega fragmenta pojavita dva. Morebiten razlog je podvojitev odseka v genomu, kjer se nahaja omenjeni mikrosatelit.



Slika 26: Analiza mikrosatelita (TTA)₇₇ pri posameznih kolonijah (vrstni red kolonij ne Sovpada z vrstnim redom v preglednici 19)

Če pogledamo rezultate iz drugega zornega kota je nekako nemogoče razumeti, da se znotraj ene kolonije pojavi takšna heterogenost oz. tolikšno število različnih mikrosatelitov. Glede na podatek, da je kvasovka *S. pastorianus* allotetraploid, lahko sklepamo, da se znotraj ene kolonije lahko pojavijo kvečemu štiri različne velikosti mikrosatelitov. V primeru omenjenega mikrosatelita (TTA)₇₇ je verjeten razlog dobljenih fragmentov zdrs polimeraze tekom pomnoževanja pri reakciji PCR ali pa so razlog nespecifične vezave začetnih oligonukleotidov po genomu. V tem primeru bi bilo zanimivo ponoviti reakcijo PCR za posamezno kolonijo, da bi videli če se pojavi isti oz. podoben vzorec fragmentov. Lahko bi poskušali tudi z optimizacijo temperature prileganja začetnih oligonukleotidov. Zdrs polimeraze je pri mikrosatelitih take oblike zelo verjeten, saj polimeraza kljub prisotnosti termostabilnega proteina ni sposobna pravilno pomnožiti tolikšnega števila ponovitev znotraj mikrosatelita.

V primeru mikrosatelita (TCG)₆ se ne pojavi tolikšno število različnih fragmentov z visoko intenziteto (Slika 27). Kljub temu pa se pojavi mnogo fragmentov z zanemarljivo maso. Podoben rezultat je tudi pri mikrosatelitih (TG)₈, (AACGAC)₆ in (AG)₁₂.



Slika 27: Analiza mikrosatelita (TCG)₆ pri posameznih kolonijah (vrstni red kolonij ne Sovpada z vrstnim redom v preglednici 19)

V primerih, kjer smo izbrali zelo malo oz. zelo veliko kolonijo, ne moremo trditi, da ima to kakšno povezavo z mikrosateliti oz. da imajo spremembe v številu ponovitev znotraj mikrosatelitov korelacijo z morfologijo celic. Glede na raziskavo Granek in sod. (2010), kjer so preučevali okoljske in genetske vplive na morfologijo kolonij kvasovk lahko predvidevamo, da ima različna velikost kolonij neko genetsko ozadje. Ugotovili so, da poleg stradanja na velikost celic vplivajo še mutacije v pomembnih genih (geni, povezani s sporulacijo). Powell in sod. (2007) pa so opazovali spremembe v morfologiji kvasovk tekom zaporedne uporabe. Tako pri ale kot lager kvasovkah niso zaznali očitnih sprememb v morfologiji. Razen pri ale kvasovkah so po 98 generacijah zaznali kvasovke, ki so manjše po velikosti in temnejše barve. Za te kolonije so dokazali, da imajo okvare v respiratornem sistemu (petit mutante). Torej spremembe na ravni morfologije nimajo povezave z genomskimi spremembami, temveč s spremembami na mitohondrijih.

4.1.5 Ustreznost izbora mikrosatelitov

Wren in sod. (2000) so prvi opisali nabor pravil pri napovedovanju hipervariabilnosti mikrosatelitov. Pri dinukleotidnih ponovitvah mora biti prisotnih vsaj 8 enot, 7 enot za trimere, 6 za tetramere, 5 za pentamere itd. V našem primeru smo se tega pravila držali le v 68 %, saj le 25 mikrosatelitov od 37 ustreza tem zahtevam. V ostalih primerih mikrosateliti vsebujejo premalo ponovitev osnovne enote. Zanimivo je, da vsi mikrosateliti $(AC)_{12}$, $(GTTGCT)_{11}$, $(TTA)_{77}$, $(TA)_{11}$ in $(AACGAC)_{6}$, pri katerih smo določili spremembe, zadostujejo omenjenim zahtevam.

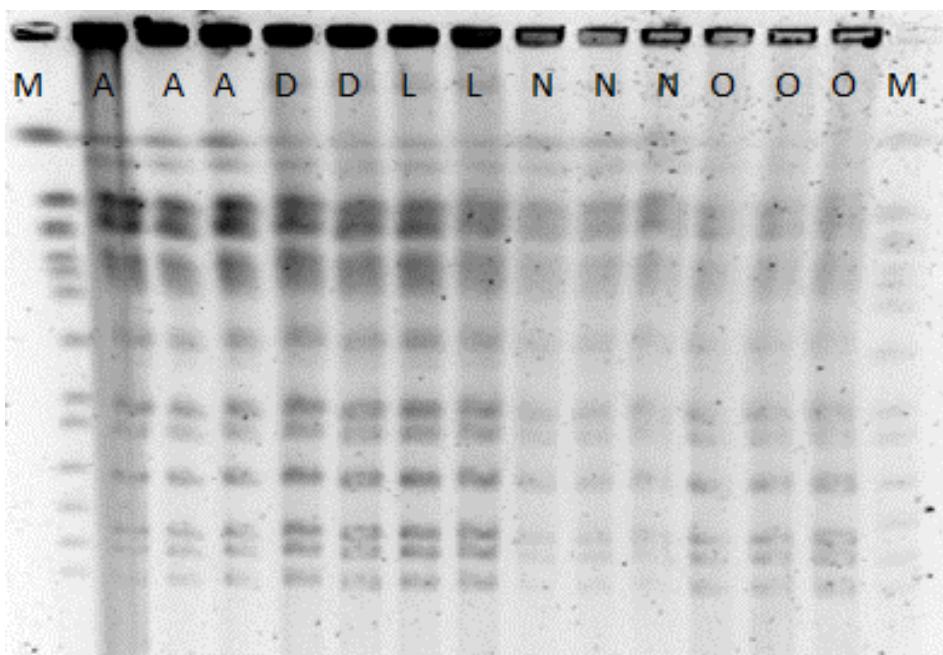
Legendre in sod. (2007) so pokazali, da so za nestabilnost oz. stabilnost ponovljivih sekvenc odgovorna število ponovitev in dolžina enote. Prav tako pa lahko na stabilnost vplivajo tudi drugi dejavniki, kot je na primer vsebnost GC nukleotidov. Pravilo, da variabilnost eksponentno narašča s številom ponovitev. Vsi mikrosateliti $((AC)_{12}$, $(GTTGCT)_{11}$, $(TTA)_{77}$, $(TA)_{11}$ in $(AACGAC)_{6}$), pri katerih smo določili spremembe, vsebujejo večje število ponovitev osnovne enote. Izpostaviti moramo mikrosatelit $(TTA)_{77}$, kjer se osnovna enota mikrosatelita ponovi kar 77-krat. Dva od petih mikrosatelitov pa vsebujeta še GC nukleotide, kar dodatno povzroči nestabilnost.

4.2 ELEKTROFORETSKA KARIOTIPIZACIJA

Z elektroforetsko kariotipizacijo smo določili kariotype oz. dolžine celotnih kromosomov pivovarskega seva ob njegovi zaporedni uporabi. Predvideva se, da med zaporedno uporabo prihaja do sprememb na nivoju kromosomov zaradi delecij, insercij in translokacij. Spremembe na nivoju kromosomov se naj bi začele pojavljati po približno 275 generacijah. Ta podatek velja za neselektivne laboratorijske pogoje. V primeru stradanja z glukozo in fosfatom pa do sprememb pride že prej. To je pri 40-50. generaciji. Ker se tekom fermentacije kvasovka deli 2 do 3-krat, to pomeni da do sprememb pride pri 13 do 25 zaporedni uporabi (Powell in Diacetis, 2007).

Že Casey (1996) je potrdil, da prihaja do polimorfizmov v dolžini kromosomov ter da se najpogosteje pojavijo pri kromosomih, ki nosijo gene, pomembne pri fermentaciji piva. To so FLO1, HXK1 in MAL4 geni. FLO1 gen je pomemben pri flokulaciji, HXK1 pri metabolizmu glukoze in MAL4 pri fermentaciji maltoze. Do sprememb pa ne pride le pri flokulaciji in porabi sladkorjev, ampak tudi pri redukciji diacetila.

Za pomoč pri določevanju velikosti kromosomov smo uporabili velikostni standard za *S. cerevisiae*. Laboratorijski, haploidni sev *S. cerevisiae* vsebuje 16 kromosomov, genom alopolidne pivovarske kvasovke *S. pastorianus* pa 36.



Slika 28: Kariotipi ob prvi (A), četrte (D), dvanajsti (L), štirinajsti (N) in petnajsti (O) zaporedni uporabi kvasa (M-standard)

Slika 28 prikazuje kariotype prve (A), četrte (D), dvanajste (L), štirinajste (N) in petnajste (O) zaporedne uporabe. Pri velikostnem standardu (*S. cerevisiae*) nam je uspelo ločiti le 13 kromosomov od 16-ih. Razlog tega je podobna velikost kromosomov XII in IV, VII in XV

ter V in VIII. Pri naših vzorcih pa smo določili en kromosom več. To je kromosom, ki leži pod kromosomom XII. Morda je to kromosom, ki ga je *S. pastorianus* pridobil od *S. eubayanus* tekom hibridizacije ali pa gre za kromosom IV, le da je manjši od kromosoma pri *S. cerevisiae* in se je prej ločil od kromosoma XII. Za pomoč glej sliko 20.

O spremembah velikosti kromosomov ne moremo govoriti, saj je ločljivost na gelu zelo slaba.

Da bi izboljšali ločljivost in bi lahko opazili razlike med kromosomi tekom zaporedne uporabe, smo poskusili z optimizacijo metode. Poskusili smo tako, da smo pripravili tanjši gel, podaljšali čas pomnoževanja, znižali tok ter gel po ločevanju spirali v vodi. Izkazalo se je, da nobena od sprememb ne vpliva na boljšo ločbo, saj nam po treh ponovitvah ni uspelo dobiti boljše slike.

Čeprav nismo določili sprememb v velikosti kromosomov ob zaporedni uporabi, publikacije kažejo, da se te vendarle dogajajo (Deželak in sod., 2014). Slika 13 prikazuje, da so spremembam najbolj podvrženi kromosomi I, IV in XII, oz. pri teh je opazno največje nihanje velikosti. Pri kromosomih II, XIV in X pa se najlepše vidi vpliv zaporedne uporabe. Elektroforetska lisa se premika čedalje nižje, kar pomeni da se kromosom krajša. Na omenjenih kromosomih ležijo tudi v naši raziskavi pomembni geni. Na kromosому II se nahajata gena MAL31 za maltozno permeazo in SUL1 za visokoafinitetno sulfatno permeazo, na kromosому 10 se nahaja gen MET3 za ATP sulfurilazo ter na kromosому XII se nahaja gen SUL2 prav tako za visokoafinitetno sulfatno permeazo. Na nestabilnih kromosomih se v večini pojavljajo geni, povezani s produkcijo sulfita. Morebiten razlog premikanja lis čedalje nižje so telomere in njihovo krajšanje ob vsaki delitvi. Spremembe v subtelomernih regijah so še toliko bolj zanimive, ker se znotraj njih nahaja veliko genov, ki so pomembni pri proizvodnji piva.

Rezultati v raziskavi Deželak in sod. (2014) kažejo, da so pridobljene elektroforetske lise za 5 do 10 % večje od velikostnega standarda. Isti pojav opisujejo tudi Tamai in sod. (1998). V našem primeru ni prišlo do tega pojava, saj so velikosti kromosomov *S. pastorianus* sorazmeroma skladne s *S. cerevisiae*. Le v primeru kromosoma III smo dobili elektroforetsko liso precej nižje, kot je ta pri velikostnem standardu. Verjetna razloga tega je delecija, ki se je pri proizvodnem sevu zgodila, vendar ni posledica zaporedne uporabe. Kariotip našega seva pa se od standarda razlikuje tudi v eni elektroforetski lisi, ki se je pojavila pod kromosomom XII. Morda je to nek nov kromosom, ki je nastal tekom kromosomskih preureditev (npr. kromosom, ki je nastal z translokacijo med kromosomoma II in IV) ali pa gre za kromosom IV, le da je manjši od kromosoma pri *S. cerevisiae* in se je prej ločil od kromosoma XII. Vse to so le predvidevanja, saj zaradi slabe ločljivosti slike ne moremo nič zagotovo trditi.

O spremembah, do katerih prihaja ob zaporedni uporabi, govorijo tudi Sato in sod. (2002). Pravijo, da so mali kromosomi (I, VI in III) dovetnejši za spremembe kot ostali

kromosomi. Nestabilnost pa naj bi bila odvisna tudi od samega seva in sestave gojišča. Nobeden od genov pomembnih v naši raziskavi ne leži na omenjenih kromosomih. Sato in sod. (2002) tudi pravijo, da so mnogo bolj nestabilni kromosomi, pri katerih je prišlo do translokacij. To sta kromosoma V in XI. Na kromosому V ne leži nobeden od pomembnih genov v naši raziskavi, na kromosому XI pa leži gen MET14 za adenilsulfat kinazo pri sintezi sulfita. O spremembah v dolžini kromosomov govorijo tudi Sato in sod. (1994), vendar članek ni dostopen na spletu.

4.3 IZRAŽANJE GENOV

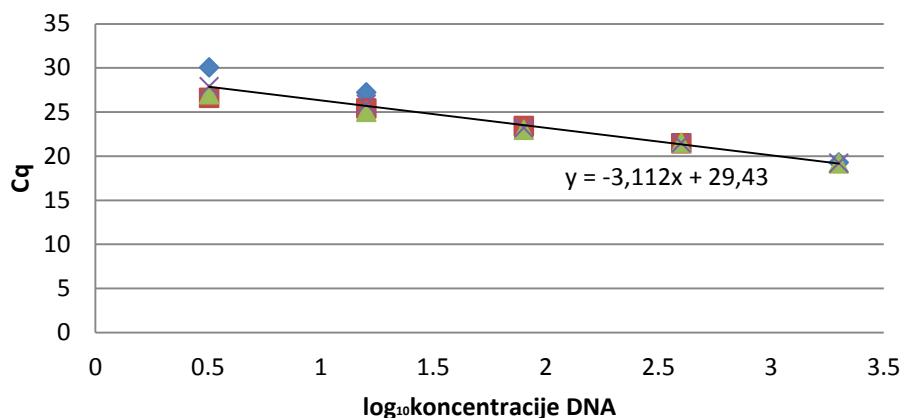
Predvidevali smo, da zaporedna uporaba starter kulture vpliva tudi na izražanje genov. Verstrepen in sod. (2005) govorijo o povezavi med mikrosateliti in izražanjem genov. Pravijo, da spremembe mikrosatelitov lahko povzročijo spremembe znotraj genov, med geni in v psevdogenih. To pripelje do sprememb v velikosti genov, kar se lahko pokaže tudi na fenotipu. Ker smo največ sprememb v mikrosatelitih zaznali v bližini gena za maltozno permeazo smo se odločili, da s pomočjo kvantitativnega PCR določimo nivo izražanja tega gena. Utišanje gena tekom zaporednih uporab lahko nakazuje na zmanjšan sprejem maltoze in maltotrioze v celico.

V ta namen smo znotraj gena MAL31 skonstruirali dva para začetnih oligonukleotidov s sondama. Izmed teh dveh začetnih oligonukleotidov je par z oznako MAL31 var 2 najbolj učinkovito pomnožil odsek gena za kvantifikacijo. Ustreznost začetnih oligonukleotidov smo določili na podlagi izračuna učinkovitosti reakcije kvantitativnega PCR, ki je morala biti okvirno 100 %. V ta namen smo izolirano RNA oz. njen prepis v cDNA kvasa zaporednih uporab združili v skupen vzorec, ter cDNA redčili s faktorjem redčitve 1:5.

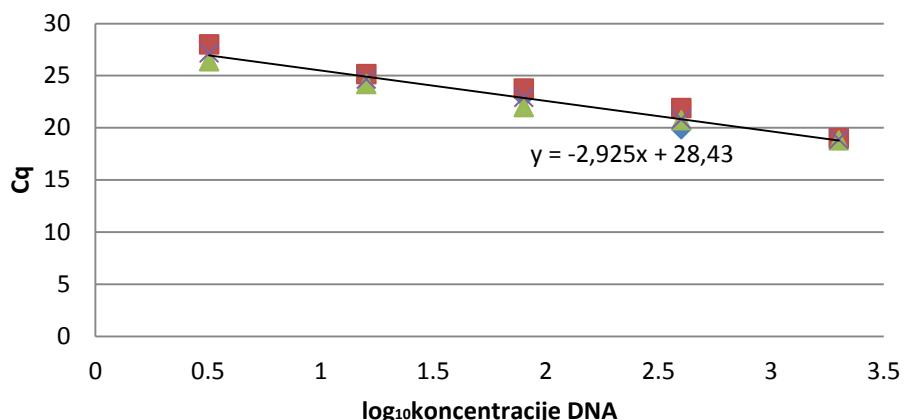
Preglednica 20: Vrednosti Cq tarčnega in referenčnega gena združenega vzorca vseh zaporednih uporab (vrednosti izločene iz analize so označene s sivo barvo)

	Virtualno število kopij	Logaritem virtualnega števila kopij	Cq tarčni gen	Cq referenčni gen
Ponovitev 1	2000	3,30	19,25	21,98
	400	2,60	nedoločeno	19,85
	80	1,90	nedoločeno	22,91
	16	1,20	27,21	35,73
	3,20	0,51	30,04	23,62
	0,64	-0,19	21,06	25,10
	0,13	-0,89	19,99	25,98
Ponovitev 2	2000	3,30	22,84	18,96
	400	2,60	21,41	21,87
	80	1,90	23,39	23,74
	16	1,20	25,38	25,11
	3,20	0,51	26,57	27,96
	0,64	-0,19	27,38	27,58
	0,13	-0,89	28,07	27,39
Ponovitev 3	2000	3,30	19,13	18,75
	400	2,60	21,51	20,69
	80	1,90	22,95	21,97
	16	1,20	25,00	24,16
	3,20	0,51	26,97	26,36
	0,64	-0,19	28,46	27,37
	0,13	-0,89	31,83	nedoločeno
Naklon			-3,112	-2,924
Presečišče			29,431	28,430
Obratni naklon			-0,320	-0,341
Obratno presečišče			9,430	9,698

Umeritveno krivuljo smo narisali na podlagi vrednosti Cq posameznih redčitev cDNA (odvisnost praznega cikla Cq od logaritemsko vrednosti koncentracije cDNA) za tarčni gen (MAL31) in referenčni gen (gen, ki kodira translacijski elongacijski faktor, TEF1). Preglednica 20 prikazuje rezultate, ki smo jih uporabili za izris umeritvene krivulje, sliki 29 in 30 pa prikazujeta izrisano umeritveno krivuljo.



Slika 29: Umeritvena krivulja za tarčni gen, MAL31 var 2



Slika 30: Umeritvena krivulja za referenčni gen, TEF1

Iz naklona krivulje (k) smo izračunali učinkovitost pomnoževanja (E) po enačbi (1).

$$E = 10^{-\frac{1}{k}} - 1 \quad \dots (1)$$

Preglednica 21: Učinkovitost pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena

	MAL31 var 2	TEF1
Naklon (k)	-3,112	-2,925
Učinkovitost (E)	1,10 (110 %)	1,20 (120 %)

Učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena so visoke. Sprejemljive vrednosti so od 90 do 110 %. Optimalno je, da v vsakem ciklu pomnoževanja iz ene kopije nastaneta dve. Vzrok učinkovitosti večje od 100 % je slaba RNA oz. DNA kvaliteta. Vzrok učinkovitosti manjše od 100 % so neoptimalne koncentracije reagentov ter neprimerni začetni oligonukleotidi. 100 % učinkovitost pomnoževanja ustreza naklonu umeritvene krivulje $k = -3.33$ (Real time... , 2015)

Pri relativni kvantifikaciji izražanja genov gre za primerjavo izražanja testnega gena v primerjavi s konstitutivno izraženimi hišnimi geni. Zato za normalizacijo eksperimentalne variabilnosti poleg želenih genov testiramo še referenčne, največkrat hišne gene. Z njimi zmanjšamo vpliv eksperimentalnih pogojev na tarčni gen. V našem primeru smo izbrali gen za transkripcijski elongacijski faktor (TEF1). Učinkovitost pomnoževanja referenčnega gena znaša 120 %.

Preglednica 22: Vrednosti Cq tarčnega in referenčnega gena zaporednih uporab (vrednosti izločene iz analize so označene s sivo barvo)

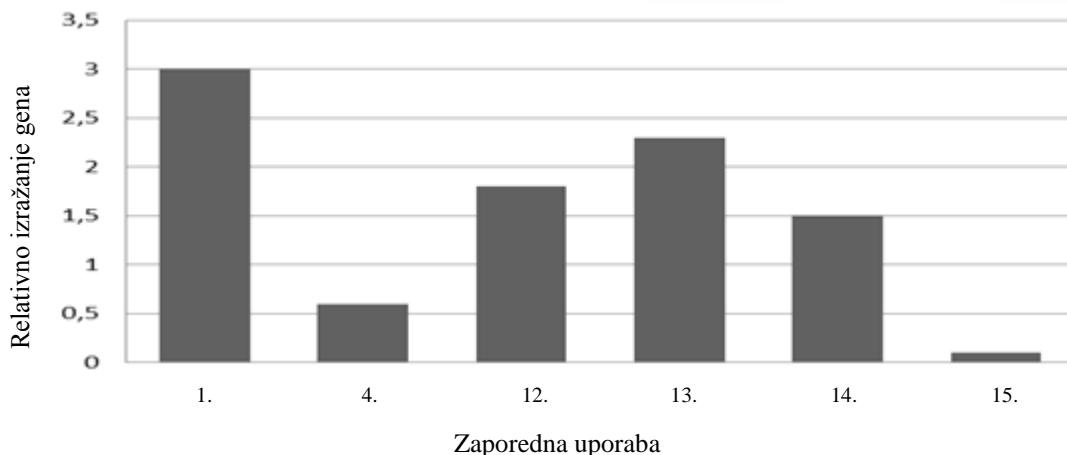
Zaporedna uporaba	Virtualno število kopij	Cq tarčnega gena	Cq referenčnega gena
Prva zaporedna uporaba	2000	18,77	17,96
	400	21,20	19,74
	80	23,00	22,47
	16	25,58	25,82
	2000	nedoločeno	17,04
	400	21,65	20,54
	80	21,44	20,49
	16	23,55	23,00
	2000	18,33	17,66
	400	21,41	19,73
	80	21,99	21,60
	16	24,31	22,41
	2000	20,13	18,32
	400	21,35	19,98
Četrta zaporedna uporaba	80	5,06	20,93
	16	24,02	22,64
	2000	18,95	17,88
	400	21,80	19,24
	80	23,00	21,58
	16	25,87	23,21
	2000	20,92	17,26
	400	22,04	19,48
	80	23,86	21,65
	16	25,64	23,63
	2000	18,16	18,29
	400	21,48	21,79
	80	23,65	23,50
	16	25,92	25,96
Dvanajsta zaporedna uporaba	2000	nedoločeno	nedoločeno
	400	21,49	21,29
	80	23,97	23,15
	16	25,00	24,49
	2000	nedoločeno	19,59
	400	21,23	21,84
	80	23,50	22,64
	16	26,49	25,30

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 22: Vrednosti Cq tarčnega in referenčnega gena zaporednih uporab«

Zaporedna uporaba	Virtualno število kopij	Cq tarčnega gena	Cq referenčnega gena
Trinajsta zaporedna uporaba	2000	nedoločeno	nedoločeno
	400	10,50	22,21
	80	25,31	24,05
	16	26,36	25,13
	2000	nedoločeno	20,56
	400	22,36	22,98
	80	24,23	24,65
	16	27,32	27,16
	2000	32,95	nedoločeno
	400	22,23	22,58
	80	24,11	23,69
	16	26,44	25,36
	2000	18,51	19,82
	400	22,89	22,20
	80	22,23	22,04
	16	24,54	22,97
Štirinajsta zaporedna uporaba	2000	19,38	nedoločeno
	400	22,16	20,87
	80	23,61	22,77
	16	24,63	23,02
	2000	19,07	18,59
	400	21,51	20,64
	80	23,46	22,32
	16	25,28	23,74
	2000	20,01	18,33
	400	21,83	20,79
	80	31,88	34,08
	16	nedoločeno	nedoločeno
	2000	19,81	18,80
	400	23,72	22,86
	80	nedoločeno	26,50
Petnajsta zaporedna uporaba	16	nedoločeno	33,22
	2000	18,60	17,79
	400	28,83	27,28
	80	35,89	nedoločeno
	16	38,48	nedoločeno

Za izračun relativnega izražanja gena za maltozni in maltotriozni transporter, smo uporabili program qBase⁺ in primerjalno metodo Cq ali metodo delta-delta Cq. To je matematični model, ki izračuna spremembe v izražanju genov, tako da pove, za kolikokrat se razlikuje izražanje tarčnega gena in referenčnega gena oz. kalibratorja (Wong in Medrano, 2005). Pri tej metodi je potrebno dokazati, da imata tako tarčni gen kot referenčni gen optimalno učinkovitost pomnoževanja. V našem primeru učinkovitosti nista bili 100 % in bi bila potrebna še nadaljnja optimizacija metode.



Slika 31: Relativno izražanje gena za maltozno permeazo z metodo delta-delta Cq

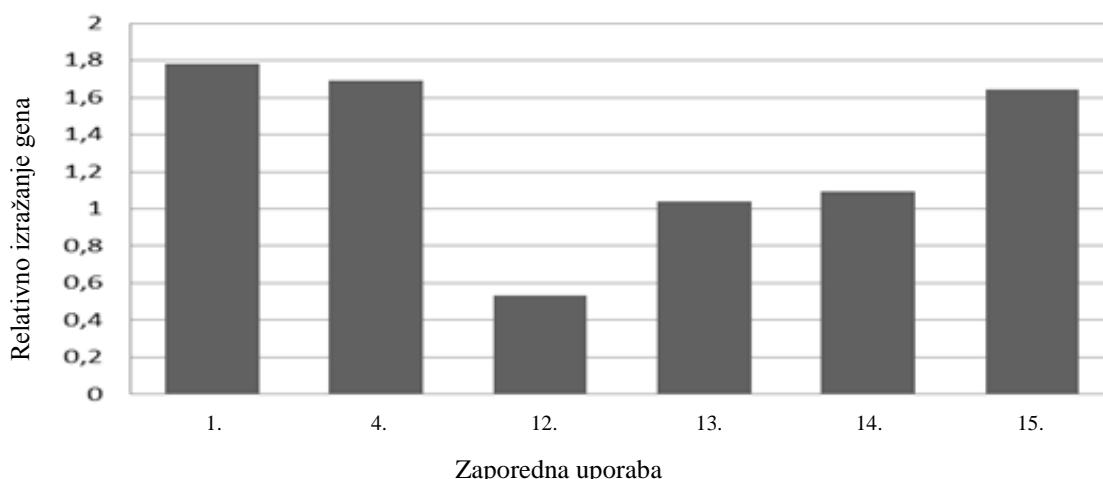
Slika 31 prikazuje relativno izražanje gena za maltozno permeazo, normaliziranega na transkripcijski elongacijski faktor.

Preglednica 23: Relativno izražanje gena za maltozno permeazo z metodo delta-delta Cq

Zaporedna fermentacija	Relativno izražanje
Prva	3
Četrta	0,6
Dvanajsta	1,8
Trinajsta	2,3
Štirinajsta	1,5
Petnajsta	0,1

Vidimo, da se izražanje gena tekom zaporednih fermentacij spreminja. Gen je ob prvi uporabi kvasa najbolj izražen, nato pa pride do utišanja. Do največjega utišanja je prišlo pri petnajsti zaporedni uporabi.

Eden izmed načinov optimizacije metode je druga metoda izračuna relativnega izražanja, ki je uporabna predvsem kadar učinkovitosti pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena nista enaki in optimalni (100 %). Odločili smo se, da rezultate obdelamo še s pomočjo analize izražanja genov iz umeritvene krivulje (Ballester in sod., 2013). V tem primeru so rezultati drugačni. Prav tako se izražanje tekom zaporednih uporab spreminja, vendar ne pride do tolikšnega utišanja gena po petnajsti zaporedni uporabi. Tukaj se izkaže, da bi bila potrebna še nadaljnja optimizacija metode.



Slika 32: Relativno izražanje gena za maltozno premeazo z metodo s pomočjo umeritvenih krivulj

Preglednica 24: Relativno izražanje gena za maltozno permeazo z metodo s pomočjo umeritvenih krivulj

Zaporedna fermentacija	Relativno izražanje
Prva	1,8
Četrta	1,7
Dvanajsta	0,5
Trinajsta	1,0
Štirinajsta	1,1
Petnajsta	1,6

Egilmez in sod. (1989) govorijo o spremembah v izražanju genov pri starajočih celicah. Preučevali so gene, ki so prednostno izraženi pri mladih ali starih celicah ter se nahajajo v jedrnem genomu. V večini gre za gene, ki so pomembni pri celičnem ciklu. Ugotovili so, da prihaja do sprememb v izražanju genov ter da so te odvisne od starosti celic.

Rezultati pridobljenim z analizo izražanja celokupne RNA (Bühligen in sod., 2013) so pokazali, da pri ponovni uporabi biomase v kvasovki ne pride do statistično značilnih sprememb. Ni jim uspelo ugotoviti sprememb pri flokulaciji in staranju, so pa opazili spremembe pri odzivu na stres. V primeru povečane koncentracije kisika se je povečalo izražanje genov za oksidativni stres. To ima pozitiven vpliv na kakovost piva.

Tudi slika 33 nakazuje, da se metabolna aktivnost tekom zaporedne uporabe zmanjšuje. S fenotipskimi testi (Omnilog, Biolog Inc.) so ugotovili statistično značilne padce sposobnosti rasti na saharovi, maltozi, manzozi, glukozi, galakozi in fruktozi kot virih ogljika po dvajseti zaporedni uporabi pivskih kvasovk (neobjavljen vir). Tudi Donnelly in Hurley (1996) govorita o fenotipskih spremembah pri uporabi sladkorjev v pivini.



Slika 33: Metabolna aktivnost kvasovk ob zaporedni uporabi na različnih virih ogljika. Lestvica metabolne aktivnosti od največje (zelena) do najmanjše (rdeče) aktivnosti (neobjavljen vir)

Glede na pridobljene rezultate lahko sklepamo, da zmanjšano oz. spremenjeno izražanje gena za maltozno permeazo neposredno vpliva na sam transport maltoze in maltotrioze. Ker maltoza in maltotriosa počasneje prehajata v celico, se s tem zmanjša stopnja fermentacije, kar ali podaljša čas fermentacije in s tem poveča stroške proizvodnje piva ali pa ostaneta neporabljeni v pivini, kar ima negativen vpliv na končne organoleptične lastnosti piva. V raziskavi bi bilo zanimivo pogledati še izražanje ostalih genov povezanih s transportom maltoze in maltotrioze.

5 SKLEPI

- Izmed 34 testiranih mikrosatelitov smo spremembe zaznali pri petih mikrosatelitih; (AC)₁₂, (GTTGCT)₁₁, (TTA)₇₇, (TA)₁₁, (AACGAC)₆. To znaša 14,7 % preiskovanih mikrosatelitov.
- Do največ sprememb v številu ponovitev mikrosatelitskih zaporedij je prišlo v bližini genov za transport maltoze in maltotrioze. To sta gena za maltozno permeazo (MAL31) in visokoafinitetni maltozni transporter (AGT1). Do posameznih sprememb je prišlo tudi v bližini genov povezanih s sintezo sulfita.
- Pivino sestavlja genetsko heterogena populacija kvasovk, ki vsebuje različno število ponovitev v posameznih mikrosatelitih.
- Po analizi posameznih kolonij ne moremo zagotovo trditi da so fragmenti z različno velikostjo posledica genetskih sprememb. Razlog so lahko zdrsi polimeraze ali nespecifične vezave začetnih oligonukleotidov tekom reakcije PCR.
- Na nivoju kromosomov nam sprememb ni uspelo ugotoviti zaradi slabe ločljivosti na gelu. Kljub temu publikacije nakazujejo, da do sprememb pride.
- S pomočjo kvantitativnega PCR smo dokazali, da se izražanje gena za maltozno permeazo tekom zaporednih uporab spreminja.
- Spremembe v številu ponovitev mikrosatelitskih zaporedij v bližini gena za maltozno permeazo in spremenjeno izražanje omenjenega gena verjetno vplivajo na sam transport maltoze in maltotrioze. Ker maltoza in maltotrioza ne moreta prehajati ali počasneje prehajata v celico, se s tem stopnja fermentacije zmanjša. Vse to lahko podaljša čas fermentacije in s tem poveča stroške proizvodnje piva, lahko pa ostajata neporabljeni v gojišču in negativno vplivata na končne organoleptične lastnosti piva.

6 POVZETEK

Saccharomyces pastorianus je kvasovka spodnjega vrenja, za katero je značilna hibridna narava. Nastala naj bi z združitvijo genomov *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces eubayanus*. Novo nastali hibrid je z združitvijo pridobil več genskih lokusov, ki nosijo pomembne tehnološke lastnosti v pivovarstvu, kot so sprejem maltoze in maltotrioze ter produkcija sulfita. V pivovarstvu se zaradi želje po znižanju stroškov poslužujejo zaporedne uporabe kvasovk. Zaradi hibridne narave je sev genetsko nestabilen, zato se v njegovem genomu dogajajo spremembe. Zaporedna uporaba predstavlja nenehno spremenjanje okolja kvasovk, kar pri njih povzroča stres. Spremembe zaradi stresa nastajajo na različnih celičnih nivojih, vendar smo se v naši raziskavi osredotočili le na nestabilne mikrosatelitske regije, spremembe na kromosomih ter izražanje genov. Pri slednjem smo se osredotočili na gen, povezan z transportom maltoze in maltotrioze, nestabilnost mikrosatelitskih zaporedij pa smo določili v okolini tehnološko pomembnih genov, kot so transporterji maltoze in maltotrioze ter geni odgovorni za produkcijo sulfita.

Pri določanju sprememb smo uporabljali vzorce kvasne biomase, odvzete v eksponentni fazi rasti pred pričetkom fermentacije in sicer v petih izmed petnajstih zaporednih fermentacijah piva v industrijskem merilu (Pivovarna Laško).

Za spremljanje mikrosatelitov smo uporabili metode kot so izolacija DNA kvasovk neposredno iz pivine s komercialnim kompletom MasterPure (Epicenter), PCR s fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi oz. PCR z univerzalnim, fluorescentno označenim začetnim oligonukleotidom, detekcija pomnožkov PCR z agarozno elektroforezo ter natančna ugotovitev dolžin pomnožkov s kapilarno elektroforezo (komercialna storitev, Macrogen). Mikrosatelitska zaporedja smo poiskali s programom WebSat in to tista, ki v ponovitvi vsebujejo vsaj dve bazi. Ker je v celotnem genomu kvasovke veliko takih mikrosatelitov, smo se omejili na bolj kompleksne. Izbrali smo le mikrosatelite, ki se nahajajo v neposredni bližini tehnološko pomembnih genov, kot so geni za sprejem maltoze in maltotrioze ter produkcijo sulfita. Nato smo tem mikrosatelitom skonstruirali začetne oligonukleotide, ki so direktno označeni z fluorescentnim barvilkom ali pa se jih označi tekom PCR reakcije s pomočjo fluorescentno označenega univerzalnega začetnega oligonukleotida. Za določanje dolžinskih polimorfizmov kromosomov z elektroforetsko kariotipizacijo smo uporabili metodi izolacije DNA kvasne biomase v gelu ter elektroforezo v pulzirajočem polju. S pomočjo teh metod bi lahko določili le večje kromosomske spremembe, zaradi nizke ločljivosti elektroforeze. Za spremljanje izražanja genov smo uporabili metode, kot sta izolacija RNA s komercialnima kompletooma RNeasy Mini Kit (Qiagen) in On-Column Dnase I Digestion Set (Sigma) iz kvasne biomase, ločevanje celokupne RNA z agarozno elektroforezo in ocena količine RNA, sinteza cDNA s pomočjo SuperScript VILO kompleta (Invitrogen), optimizacija koncentracij sond in začetnih oligonukleotidov ter kvantitativni PCR. Opazovali smo spremembe v izražanju

genov za transport maltoze in maltotrioze. Vsem omenjenim metodam je na koncu sledila še računalniška obdelava rezultatov.

Na začetku raziskave smo si postavili delovne hipoteze, (1) da bo na nivoju mikrosatelitov prišlo do sprememb v številu ponovitev posameznega mikrosatelita, (2) da bo na nivoju kromosomov prišlo do sprememb dolžin kromosomov zaradi insercij/delecij med mitoznimi delitvami ter (3) da bo na nivoju izražanja genov prišlo do sprememb v izražanju transporterjev za maltozo in maltotriozo zaradi prilagoditve kvasovke na substrat.

Za analizo mikrosatelitov smo najprej s pomočjo programa WebSat v genomu *S. pastorianus* določili 1424 mikrosatelitov, ki vsebujejo vsaj 6 ponovitev po dve bazi. Ker je to preveliko število mikrosatelitov za analizo, smo se odločili, da v nadaljnji analizi uporabimo le mikrosatelite v bližini genov, ki kodirajo tehnološko pomembne lastnosti kvasovke. To so geni za α -glikozidne transporterje, sulfat permeaze, ATP sulfuriuze, adenil sulfat kinaze, 3'-fosfoadenilsulfat reduktaze in plazemske membranske sulfitne črpalke. Tako smo število mikrosatelitov zmanjšali na 37. Za vse mikrosatelite smo skonstruirali začetne oligonukleotide, eni so bili neposredno fluorescentno označeni, drugi pa se fluorescentno označijo posredno preko univerzalnega začetnega oligonukleotida tekom reakcije PCR. S pomočjo reakcije PCR smo pomnožili mikrosatelitske regije. Pomnožke PCR smo nato ločili z gelsko elektroforezo in potrdili ustreznost izbranih začetnih oligonukleotidov. V tej fazi smo iz analize izključili tri mikrosatelite. Da smo pridobili natančne dolžine pomnoženih fragmentov, smo pomnožke PCR poslali v analizo v Macrogen (Južna Koreja), kjer so jih ločili s kapilarno elektroforezo, ki je mnogo bolj občutljiva in natančna od gelske elektroforeze. Izmed 34 testiranih mikrosatelitov smo spremembe v številu ponovitev tekom zaporedne uporabe zaznali le pri 5 mikrosatelitih, in sicer $(AC)_{12}$, $(GTTGCT)_{11}$, $(TTA)_{77}$, $(TA)_{11}$ in $(AACGAC)_{6}$. To znaša 14,7 %. Večina teh mikrosatelitov se nahaja v bližini genov, odgovornih za transport maltoze, maltotrioze in sulfita v celico. Da bi ugotovili, pri kateri zaporedni uporabi so se začele spremembe dogajati, smo za mikrosatelite $(AC)_{12}$, $(GTTGCT)_{11}$, $(TA)_{11}$ ponovili poskus za vse zaporedne uporabe kvasovk. Rezultati so pokazali, da s pomnožitvijo mikrosatelitov ne dobimo le enega fragmenta, ampak več. Ti fragmenti se razlikujejo v številu ponovitev osnovne enote mikrosatelita. Morebitni razlog dobljenih rezultatov je genetsko heterogena sestava kvasne biomase, zdrs polimeraze *Taq* med pomnoževanjem s PCR in posledično nepravilno parjenje vijačnice med sintezo DNA ali pa nespecifično prileganje začetnih oligonukleotidov tekom reakcije PCR. Da bi razjasnili dobljene rezultate, smo iz biomase zaporednih fermentacij pripravili redčitve do posameznih kolonij ter pri reakciji PCR uporabili specifično polimerazo. Rezultati so pokazali, da je celokupna biomasa odvzeta neposredno iz fermentorja dejansko genetsko heterogena in da posamezne kolonije vsebujejo mikrosatelite različnih dolžin, ki se razlikujejo v številu ponovitev.

Z elektroforetsko kariotipizacijo smo določili kariotipe oz. dolžine celotnih kromosomov pivovarskega seva ob njegovi zaporedni uporabi. Predvidevali smo, da med zaporedno

uporabo prihaja do sprememb na nivoju kromosomov zaradi delecij, insercij in translokacij. Pri velikostnem standardu nam je uspelo ločiti le 13 kromosomov od 16-ih. Razlog tega je podobna velikost kromosomov XII in IV, VII in XV ter V in VIII. Pri naših vzorcih pa smo določili en kromosom več. To je kromosom, ki leži pod kromosomom XII. Morda je to kromosom, ki ga je *S. pastorianus* pridobil od *S. eubayanus* tekom hibridizacije ali pa gre za kromosom IV, le da je manjši od kromosoma pri *S. cerevisiae* in se je prej ločil od kromosoma XII. Sprememb v dolžini kromosomov med zaporedno uporabo nam ni uspelo dokazati, vendar publikacije kažejo, da do njih pride.

Predvidevali smo, da zaporedna uporaba starter kulture in spremembe v številu ponovitev osnovne enote mikrosatelita vplivajo na izražanje genov. V ta namen smo preučevali izražanje gena za maltozno permeazo ter tako morebiti določili zmanjšan sprejem maltoze in maltotrize v celico. V prvi fazi smo morali skonstruirati dva para začetnih oligonukleotidov s sondama. Rezultate izražanja gena, pridobljenih z kvantitativnim PCR, smo obdelali s pomočjo programa qBase+ (Biogazelle) ter s pomočjo umeritvenih krivulj. Kot dober par začetnih oligonukleotidov se je izkazal par z oznako MAL31 var 2. Ustreznost začetnih oligonukleotidov smo določili na podlagi izračuna učinkovitosti reakcije kvantitativnega PCR. Z metodo delta-delta Cq smo pokazali, da se izražanje maltoznegata gena, normaliziranega na transkripcijski elongacijski faktor, tekom zaporedne uporabe spreminja. Tudi rezultati obdelani s pomočjo umeritvenih krivulj so pokazali, da se izražanje tekom zaporedne uporabe spreminja. Z obema metodama smo dobili različna relativna izražanja gena. Verjeten razlog tega je različna učinkovitost pomnoževanja tarčnega in referenčnega gena. Potrebna bi bila optimizacija metode.

Glede na pridobljene rezultate lahko sklepamo, da spremembe v številu ponovitev mikrosatelitskih zaporedij v bližini gena za maltozno permeazo in zmanjšano izražanje gena za ta transporter neposredno vplivajo na sam transport maltoze in maltotrioze. Ker maltoza in maltotriosa ne moreta prehajati ali počasneje prehajata v celico, se s tem zmanjša stopnja fermentacije. Vse to lahko podaljša čas fermentacije in s tem poveča stroške proizvodnje piva, lahko pa ostajata neporabljeni v gojišču in negativno vplivata na končne organoleptične lastnosti piva.

7 VIRI

Real-time PCR technology basics. BioSistemika.

<http://biosistemika.com/workshops/qpcr-basics/> (13. jun. 2015)

Ballester M., Cordón R., Folch J. M. 2013. DAG expression: High-throughput gene expression analysis of real-time PCR data using standard curves for relative quantification. PLoS ONE, 8, 11: 8-12

Bing J., Han P. J., Liu W. Q., Wang Q. M., Bai F. Y. 2014. Evidence for a far east asian origin of lager beer yeast. Current Biology, 24, 10: 380-381

Boyer R. F., Prevod Zorko M., Renko M. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana. Študentska založba: 634 str.

Bühligen F., Rüdinger P., Fetzer I., Stahl F., Scheper T., Harms H., Müller S. 2013. Sustainability of industrial yeast serial repitching practice studied by gene expression and correlation analysis. Journal of Biotechnology, 168, 4: 718-28

Bühligen F., Lindner P., Fetzer I., Stahl F., Scheper T., Harms H., Müller S. 2014. Analysis of aging in lager brewing yeast during serial repitching. Journal of Biotechnology, 187: 60-70

Bustamante C., Gurrieri S., Smith S. 1993. Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis. Trends in Biotechnology, 11, 1: 23-30

Carle G. F., Olson M. V. 1985. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. Nucleic Acids Research, 12: 5647-5664

Casey, G. P. 1996. Practical applications of pulsed field electrophoresis and yeast chromosome fingerprinting in brewing QA and R&D. Master Brewers Association of the Americas Technical, 33: 1-10

Chow T. H. C., Sollitti P., J. Marmur. 1989. Structure of the multigene family of MAL loci in *Saccharomyces*. Molecular and General Genetics MGG, 217, 1: 60-69

Cyttaria. Wikipedia.

<https://en.wikipedia.org/wiki/Cyttaria> (13. jun. 2015)

Deželak M., Gebremariam M.nM., Čadež N., Zupan J., Raspor P., Zarnkow M., Košir I. J. 2014. The influence of serial repitching of *Saccharomyces pastorianus* on its karyotype and protein profile during the fermentation of gluten-free buckwheat and quinoa wort. International Journal of Food Microbiology, 185: 93-102

- Deželak M. 2014. Beer-like gluten-free beverages fermented from buckwheat and quinoa. Doctoral Dissertation. Ljubljana, University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific field Biotechnology: 195 str.
- DiArc resource for eukaryotic genome research.
http://www.diark.org/diark/species_list/Saccharomyces_pastorianus_CCY48_-_91
(10. maj 2015)
- Donnelly D., Hurley J. 1996. Yeast monitoring: The Guinness experience. Fermentation, 9: 283-286
- Egilmez N. K., Chen J. B., Jazwinski S. M. 1989. Specific alterations in transcript prevalence during the yeast life span. The Journal of Biological Chemistry, 264, 24: 14312-14317
- FastStart High Fidelity PCR System. Roche.
<https://lifescience.roche.com/shop/en/global/products/faststart-high-fidelity-pcr-system> (13. jun. 2015)
- Gibson B. R., Boulton C. A., Box W. G., Graham N. S., Lawrence S. J., Linforth R. S. T., Smart K. A. 2008. Carbohydrate utilization and the lager yeast transcriptome during brewery fermentation. Yeast, 25, 8: 549-562
- Gibson B., Liti G. 2015. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. Yeast, 32, 1: 17-27
- Granek J. A., Magwene P. M. 2010. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. PLoS Genetics, 6, 1: e1000823. doi: 10.1371/journal.pgen.1000823: 12 str.
- He Y., Dong J., Yin H., Zhao Y., Chen R., Wan X., Chen P., Hou X., Liu J., Chen L. 2014. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. Journal of the Institute of Brewing, 120, 3: 157-163
- Jenkins C. L. 2003. Impact of serial repitching on lager brewing yeast quality. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 61, 1:1-9
- Kako nastane pivo. Pivovarna Laško.
<http://www.pivo-lasko.si/blagovne-znamke/o-pivu/kako-nastane-pivo> (4. mar. 2015)
- Kočar N. 2012. Vpliv zaporedne uporabe kvasovke *Saccharomyces pastorianus* na dinamiko izkoriščanja sladkorjev iz pivine. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij biotehnologije: 192 str.

- Legendre M., Pochet N., Pak T., Verstrepen K. J. 2007. Sequence-based estimation of minisatellite and microsatellite repeat variability. *Genome Research*, 17, 12: 1787-1796
- Libkind D., Hittinger C. T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J. P. 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *PNAS*, 108, 35: 14539-14544
- Martins W. S., Lucas D. C. S., Neves K. F. S., Bertioli D. J. 2009. WebSat - A web software for microsatellite marker development, *Bioinformation*, 3, 6: 282-283
- Nakao O., Kanamori T. A., Itoh T A., Kodama Y U., Rainieri S A., Nakamura N O., Shimonaga T. O., Hattori M. A., Ashikari T O. 2009. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research*, 16: 115-129
- Nelson D. L., Cox M. M. 2008. Lehninger principles of biochemistry. 5. izdaja. New York, W.H. Freeman and Company: 528 str.
- Peris D., Sylvester K., Libkind D., Gonçalves P., Sampaio JP., Alexander WG., Hittinger CT. 2014. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Molecular Ecology*, 23, 8: 2031-2045
- Povhe Jemec K. 2003. Mikrobnna združba kvasovk v moštu malvazije in njen vpliv na potek alkoholne fermentacije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 133 str.
- Powell C. D., Diacetis A. N. 2007. Long term serial repitching and the genetic and phenotypic stability of brewer's yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 113, 1: 67-74
- Powell C.D., Van Zandycke S.M., Quain, D.E., Smart K.A. 2000. Replicative aging and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations. *Microbiology*, 146: 95-99
- Raspor P., Smole Možina S., Čadež N. 2000. Identification of yeasts from grape/must/wine system. V: Methods in biotechnology. Vol. 14: Food microbiology protocols. Ragout J.F. T., de Spencer A. L. (eds.). Totowa, Humana Press: 495 str.
- Sato M., Watari J., Sahara H., Koshino S. 1994. Instability in electrophoretic karyotype of brewing yeasts. *American Society of Brewing Chemists*, 52: 148-151
- Sato M., Watari J., Takashio M. 2002. Effect of growth and strains on structural stability in small chromosomes (chromosome I, VI and III) of bottom-fermenting yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 108, 3: 283-185

- Schlötterer C., Harr, B. 2004. Microsatellite instability. Encyclopedia of Life Sciences.
<http://www.els.net> (14. apr. 2016)
- Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments.
Nature Biotechnology, 18: 233-234
- SGD. Saccharomyces Genome Database.
<http://www.yeastgenome.org/> (20. jun. 2015)
- Shinde D., Lai Y., Sun F., Arnheim N. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. Nucleic Acids Research, 31, 3: 974-980
- Sia E. A., Kokoska R. J., Dominska M., Greenwell P., Petes T. D. 1997. Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and dna mismatch repair genes. Molecular And Cellular Biology, 17, 5: 2851-2858
- Steinbüchel A. 2010. Mikrobiologisches praktikum.
<http://extras.springer.com/2010/978-3-642-17702-6/HTML/Abbildungen> (16. jun. 2015)
- Stratford M. 1992. Yeast flocculation: a new perspective. Advances in Microbial Physiology, 33: 2-71
- Štajner N. 2010. Mikrosatelitski markerji uporabni za identifikacijo kultivarjev vinske trte (*Vitis vinifera L.*). Acta agriculturae Slovenica, 95, 2: 183-192
- Tamai Y., Momma T., Yoshimoto H., Kaneko X. 1998. Coexistence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. Yeast, 14: 923-933
- Verstrepen K. J., Jansen A., Lewitter F., Fink G. R. 2005. Intron tandem repeats generate functional variability. Nature Genetics, 37, 9: 986-990
- Vidgren V. 2010. Maltose and maltotriose transport into ale and lager brewer's yeast strains. Doctoral Dissertation. Helsinki, University of Helsinki, Faculty of Biological and Environmental Sciences, Department of Biosciences, Division of Genetics: 93 str.
- Vidgren V., Londesborough J. 2011. 125th anniversary review: yeast flocculation and sedimentation in brewing, Journal of the Institute of Brewing, 117, 4: 475-487
- Wendland J. 2014. Lager yeast comes of age. Eukaryotic Cell, 13, 10: 1256-1265
- Wong M. L., Medrano J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. BioTechniques, 39, 1: 75-85

Wren J. D., Forgacs E., Fondon J. W., Pertsemidis A., Cheng S. Y., Gallardo T., Williams R. S., Shohet R. V., Minna J. D., Garner H. R. 2000. Repeat polymorphisms within gene regions: Phenotypic and evolutionary implications. American Journal of Human Genetics, 67, 2: 345-35

Zastrow C. R., Mattos M. A., Hollatz C., Stambuk B. U. 2000. Maltotriose metabolism by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, 22, 6: 455-459

ZAHVALA

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Neži Čadež za potrežljivo usmerjanje in pomoč tekom raziskovalnega dela ter za pregled magistrskega dela.

Zahvala gre tudi mentorici prof. dr. Sonji Smole Možina in recenzentu doc. dr. Tomažu Accettu za pregled magistrskega dela.

Hvala tudi Juretu Zupanu za pomoč v začetni fazи raziskovalnega dela.

Posebna zahvala gre moji družini in fantu Davidu za vso podporo tekom študija in pri izpeljavi magistrskega dela.

PRILOGA A

Vrednosti Cq testnega in referenčnega vzorca ter izračun relativnega izražanja z metodo s pomočjo umeritvenih krivulj.

Referenčni gen	Vrednosti Cq	Virtualno število kopij	Logaritem števila kopij (Cq*Obratni naklon TARČNI GEN+Obratni intercept TARČNI GEN)	Anti logaritem števila kopij	Število kopij (povprečje ponovitev)	Končno število kopij (upoštevana redčitev)
Prva zaporedna uporaba	17,96	2000	3,68	4768,39	6720,28	6720,28
	19,74	400	3,11	1290,52	1102,76	5513,78
	22,47	80	2,24	171,85	249,53	6238,21
	25,82	16	1,16	14,51	97,27	12158,14
	17,04	2000	3,97	9422,82		
	20,54	400	2,86	716,54		
	20,49	80				
	23,00	16				
	17,66	2000	3,78	5969,63		
	19,73	400	3,11	1301,21		
	21,60	80	2,51	327,21		
	22,41	16	2,26	180,02		
Četrta zaporedna uporaba	18,32	2000	3,56	3658,34	5594,34	5594,34
	19,98	400	3,03	1077,00	1501,19	7505,97
	20,93	80	2,73	537,50	395,08	9877,09
	22,64	16	2,18	152,32	108,33	13541,18
	17,88	2000	3,71	5084,29		
	19,24	400	3,27	1866,92		
	21,58	80	2,52	332,75		
	23,21	16	2,00	99,48		
	17,26	2000	3,91	8040,39		
	19,48	400	3,19	1559,66		
	21,65	80	2,50	315,00		
	23,63	16	1,86	73,19		
Dvanajsta zaporedna uporaba	18,29	2000	3,57	3746,16	2592,82	2592,82
	21,79	400	2,45	284,15	322,85	1614,24
	23,50	80	1,91	80,57	112,15	2803,67
	25,96	16	1,12	13,13	24,45	3055,67
	Nedoločeno	2000				
	21,29	400	2,61	409,94		
	23,15	80	2,02	104,24		
	24,49	16	1,59	38,86		
	19,59	2000	3,16	1439,47		
	21,84	400	2,44	274,45		
	22,64	80	2,18	151,63		
	25,30	16	1,33	21,35		

»se nadaljuje«

Jančič N. Določitev genetskih sprememb ob zaporedni uporabi kvasovke ... pri proizvodnji piva.

Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2016

Trinajsta zaporedna uporaba	Nedoločeno	2000			705,70	705,70
	22,21	400	2,32	207,89	161,80	809,00
	24,05	80	1,73	53,78	52,70	1317,60
	25,13	16	1,38	24,20	16,68	2084,72
	20,56	2000	2,85	705,70		
	22,98	400	2,07	118,30		
	24,65	80	1,54	34,57		
	27,16	16	0,73	5,43		
	Nedoločeno	2000				
	22,58	400	2,20	159,21		
Širinajsta zaporedna uporaba	23,69	80	1,84	69,77		
	25,36	16	1,31	20,40		
	19,82	2000	3,08	1211,52	2104,53	2104,53
	22,20	400	2,32	209,37	476,70	2383,48
	22,04	80			165,00	4124,91
	22,97	16			91,02	11377,06
	Nedoločeno	2000				
	20,87	400	2,75	558,31		
	22,77	80	2,14	138,36		
	23,02	16	2,06	114,61		
Petnajsta zaporedna uporaba	18,59	2000	3,48	2997,54		
	20,64	400	2,82	662,40		
	22,32	80	2,28	191,63		
	23,74	16	1,83	67,42		
	18,33	2000	3,56	3633,94	3877,77	3877,77
	20,79	400	2,77	595,49	362,26	1811,28
	34,08	80			8,80	220,04
	Nedoločeno	16				
	18,80	2000	3,41	2570,35		
	22,86	400	2,11	129,02		
	26,50	80	0,94	8,80		
	33,22	16				
	17,79	2000	3,73	5429,02		
	27,28	400				
	Nedoločeno	80				
	Nedoločeno	16				

Jančič N. Določitev genetskih sprememb ob zaporedni uporabi kvasovke ... pri proizvodnji piva.
 Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2016

Testni gen	Vrednosti Cq	Virtualno število kopij	Logaritem virtualnega števila kopij	Logaritem števila kopij (Cq*Obratni naklon TEF+Obratni intercept TEF)	Anti logaritem števila kopij	Število kopij (povprečje ponovitev)	Končno število kopij (upoštevana redčitev)	Število kopij referenčnega gena	Razmerje med številom kopij tarčnega in referenčnega gena	Povprečje vrednosti	Relativno izražanje (logaritem vrednosti)
Prva zaporedna uporaba	18,77	2000	3,30	3,30	1998,17	2406,37	2406,37	6720,28	0,36	0,29	-1,8
	21,20	400	2,60	2,47	295,05	250,93	1254,67	5513,78	0,23		
	23,00	80	1,90	1,86	71,74	71,74	1793,50	6238,21	0,29		
	25,58	16	1,20	0,98	9,50			12158,14			
	Nedoločeno	2000	3,30								
	21,65	400	2,60	2,32	207,23						
	21,44	80	1,90								
	23,55	16	1,20								
	18,33	2000	3,30	3,45	2814,57						
	21,41	400	2,60	2,40	250,52						
Četrtta zaporedna uporaba	21,99	80	1,90								
	24,31	16	1,20	1,41	25,63						
	18,13	2000	3,30	3,52	3289,11	3304,58	3304,58	5594,34	0,59	0,31	-1,7
	21,35	400	2,60	2,42	263,27	305,419	1527,10	7505,97	0,20		
	5,06	80	1,90			65,2627	1631,57	9877,09	0,17		
	24,02	16	1,20	1,51	32,34	30,177	3772,11	13541,18	0,28		
	18,05	2000	3,30	3,54	3503,39						
	21,10	400	2,60	2,5	319,16						
	23,00	80	1,90	1,86	71,84						
	24,17	16	1,20	1,46	28,77						
Dvanajsta zaporedna uporaba	18,20	2000	3,30	3,49	3121,24						
	21,04	400	2,60	2,52	333,84						
	23,26	80	1,90	1,77	58,68						
	24,14	16	1,20	1,47	29,42						
	18,16	2000	3,30	3,51	3221,53	3221,53	3221,53	2592,82	1,24	0,69	-0,5
	21,48	400	2,60	2,37	236,75	253,52	1267,61	1614,24	0,79		
	23,65	80	1,90	1,63	43,05	41,75	1043,67	2803,67	0,37		
	25,92	16	1,20	0,86	7,26	8,97	1120,73	3055,67	0,37		
	Nedoločeno	2000	3,30								
	21,49	400	2,60	2,37	235,26						
	23,97	80	1,90	1,53	33,63						
	25,00	16	1,20	1,18	15,00						
	Nedoločeno	2000	3,30								
	21,23	400	2,60	2,46	288,55						
	23,50	80	1,90	1,69	48,56						
	26,49	16	1,20	0,67	4,64						

»se nadaljuje«

Jančič N. Določitev genetskih sprememb ob zaporedni uporabi kvasovke ... pri proizvodnji piva.

Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2016

Trinajsta zaporedna uporaba	Nedoločeno	2000	3,30			705,70		0,49	-1,0
	10,50	400	2,60			125,16	625,80	0,77	
	25,31	80	1,90	1,07	11,70	23,03	575,78	1317,60	0,44
	26,36	16	1,20	0,71	5,16	4,14	517,60	2084,72	0,25
	Nedoločeno	2000	3,30						
	22,36	400	2,60	2,08	119,07				
	24,23	80	1,90	1,44	27,36				
	27,32	16	1,20	0,38	2,43				
	32,95	2000	3,30						
	22,23	400	2,60	2,12	131,24				
	24,11	80	1,90	1,48	30,03				
	26,44	16	1,20	0,68	4,83				
Širinajsta zaporedna uporaba	18,51	2000	3,30	3,39	2437,50	1746,90	1746,90	2104,53	0,83
	22,89	400	2,60		185,17	925,83	2383,48		0,39
	22,23	80	1,90	2,12	131,39	75,44	1885,97	4124,91	0,46
	24,54	16	1,20	1,33	21,48	17,81	2226,60	11377,06	0,20
	19,38	2000	3,30	3,09	1232,83				
	22,16	400	2,60	2,14	138,77				
	23,61	80	1,90	1,65	44,63				
	24,63	16	1,20	1,30	19,96				
	19,07	2000	3,30	3,20	1570,37				
	21,51	400	2,60	2,36	231,56				
	23,46	80	1,90	1,70	50,30				
	25,28	16	1,20	1,08	12,01				
Petajsta zaporedna uporaba	20,01	2000	3,30	2,88	753,73	1303,98	1303,98	3877,77	0,34
	21,83	400	2,60	2,26	179,93	110,36	551,80	1811,28	0,30
	31,88	80	1,90					220,04	
	Nedoločeno	16	1,20						
	19,81	2000	3,30	2,95	883,12				
	23,72	400	2,60	1,61	40,79				
	Nedoločeno	80	1,90						
	Nedoločeno	16	1,20						
	18,60	2000	3,30	3,36	2275,10				
	28,83	400	2,60						
	35,89	80	1,90						
	38,48	16	1,20						