

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nataša CIBER

**ANALIZA PROTEOMA PIVSKIH KVASOVK
Saccharomyces pastorianus ZAPOREDNIH ŠARŽ
FERMENTACIJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Nataša CIBER

**ANALIZA PROTEOMA PIVSKIH KVASOVK *Saccharomyces pastorianus*
ZAPOREDNIH ŠARŽ FERMENTACIJ**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

PROTEOME ANALYSIS OF BREWER'S YEAST *Saccharomyces pastorianus* DURING SUBSEQUENT SERIAL FERMENTATION

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Polono Jamnik, za recenzentko pa doc. dr. Mašo Vodovnik.

Mentorica: prof. dr. Polona Jamnik

Recenzentka: doc. dr. Maša Vodovnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Polona JAMNIK
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Maša VODOVNIK
 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 neodplačano, 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.

Nataša Ciber

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 663.123:582.282.23:577.12(043)=163.6
KG pivske kvasovke/*Saccharomyces pastorianus*/proteomika/zaporedne šarže fermentacije/diferencialno izraženi proteini/stresni proteini/glikolitični encimi
AV CIBER, Nataša, dipl. mikrobiol. (UN)
SA JAMNIK, Polona (mentorica)/VODOVNIK, Maša (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2016
IN ANALIZA PROTEOMA PIVSKIH KVASOVK *Saccharomyces pastorianus* ZAPOREDNIH ŠARŽ FERMENTACIJ
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XIV, 64 str., 11 pregl., 16 sl., 12 pril., 120 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V okviru magistrskega dela smo spremljali spreminjanje proteinskega profila pivske kvasovke vrste *Saccharomyces pastorianus* skozi različne zaporedne šarže fermentacije. Vzorce kvasne biomase smo pridobili v sodelovanju s Pivovarno Laško. Vzorci so bili odvzeti v različnih zaporednih šaržah fermentacije (1., 8., 12., 14. in 15.), in sicer vedno po končanem procesu fermentacije. Proteine celičnega ekstrakta smo analizirali z dvo-dimenzionalno gelsko elektroforezo. Po pregledu in analizi gelov različnih generacij smo opazili spremembe proteinskega profila med generacijami. Kot referenčni gel smo izbrali generacijo 1, ki nam je služila za primerjavo ostalih gelov. Do statistično značilnih sprememb je prišlo pri generacijah 12 in 14, kjer se je raven večine diferencialnih proteinov znižala glede na generacijo 1. Kvasovke so v 1. generaciji izpostavljene največjim spremembam, zato je bila raven glikolitičnih encimov in stresnih proteinov povišana v primerjavi z ostalimi generacijami. Sicer pa smo lahko opazili trend upadanja izražanja do generacij 12-14, ki se je proti končni generaciji postopoma zvišal. Prav tako smo opazili, da so bili nekateri proteini na gelu prisotni na večih mestih. To nakazuje na različne izoblike ali posttranslacijske modifikacije, lahko pa je to posledica fragmentacije proteinov. Rezultati proteomske analize so pokazali, da diferencialno izraženi proteini sodijo večinoma v skupino glikolitičnih encimov in stresnih proteinov, zato bi s spremeljanjem njihovega izražanja lahko spremljali vitalnost kulture in posledično uspešnost fermentacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 663.123:582.282.23:577.12(043)=163.6
CX brewer's yeast/*Saccharomyces pastorianus*/proteomics/serial batch fermentation/
differentially expressed proteins/stress proteins/glycolytic enzymes
AU CIBER, Nataša
AA JAMNIK, Polona (supervisor)/VODOVNIK, Maša (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TI PROTEOME ANALYSIS OF BREWER'S YEAST *Saccharomyces pastorianus*
DURING SUBSEQUENT SERIAL FERMENTATION
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XIV, 64 p., 11 tab., 16 fig., 12 ann., 120 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the context of the master work, changing of the protein profile of brewer's yeast *Saccharomyces pastorianus* during serial repitching was monitored. Samples of the yeast biomass were obtained in cooperation with Pivovarna Laško. Samples were taken at various serial fermentation batches (1, 8, 12, 14 and 15), always at the end of each fermentation. The proteins of the cell extract were analyzed by two-dimensional electrophoresis. After reviewing and analyzing the gels of different generations, changing protein profile between generations was observed. Generation 1 was chosen as a reference gel, to which we compared the other gels. Statistically significant differences occurred in the generations 12 and 14, where the level of the majority of differential proteins decreased in relation to the first generation. In the first generation yeast are exposed to major changes, so the level of glycolytic enzymes and stress proteins increased compared to other generations. Otherwise, we may see a downward expression trend to generations 12-14, which has gradually increased toward final generation. We have also noticed that some of the proteins in the gel were present at several locations. This indicates a different isoform or post-translational modifications, but may also be a consequence of fragmentation of the protein. The results of proteomic analysis revealed that differentially expressed proteins belong mostly to the group of glycolytic enzymes and stress proteins, by monitoring their expression we could monitor the culture vitality and thus the success of the fermentation.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJI NALOGE.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROIZVODNJA PIVA.....	3
2.1.1 Pivovarstvo skozi čas	3
2.1.2 Proizvodnja piva kot jo poznamo danes.....	4
2.1.2.1 Proizvodnja slada.....	4
2.1.2.2 Proizvodnja pivine	5
2.1.2.3 Fermentacija.....	5
2.1.3 Osnovne surovine za proizvodnjo piva	6
2.1.3.1 Voda.....	6
2.1.3.2 Ječmen in njegovi nadomestki	6
2.1.3.3 Hmelj	6
2.1.3.4 Kvasovke	7
2.2 KVASOVKE	7
2.2.1 Izvor kvasovk lager <i>Saccharomyces pastorianus</i>.....	7
2.2.2 Prednosti kvasovk <i>Saccharomyces pastorianus</i> pred kvasovkami ale.....	8
2.3 METABOLITI KVASOVK MED FERMENTACIJO PIVA	8
2.3.1 Alkoholna fermentacija.....	9
2.3.2 Drugi metabolni produkti	10
2.4 IZPOSTAVLJENOST KVASOVK <i>Saccharomyces pastorianus</i> STRESNIM RAZMERAM MED FERMENTACIJO	10
2.4.1 Stresni odziv	11

2.4.2	Oksidativni stres	11
2.4.3	Osmotski stres	12
2.4.4	Znižanje pH	13
2.4.5	Anaerobni premik	13
2.4.6	Toksičnost etanola	13
2.4.7	Pomanjkanje hranil	14
2.4.8	Ohladitveni šok	14
2.5	PREUČEVANJE STRESNEGA ODGOVORA NA RAVNI PROTEOMA	15
3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	POTEK DELA	17
3.2	MATERIALI	18
3.2.1	Mikroorganizem	18
3.2.2	Raztopine in reagenti	18
3.2.2.1	Ekstrakcija proteinov iz celic kvasovk	18
3.2.2.2	Merjenje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu	19
3.2.2.3	Čiščenje proteinov v ekstraktu – komplet: "2-D Clean Up" kit	19
3.2.2.4	Ločevanje proteinov v 1. dimenziji	19
3.2.2.5	Ločevanje proteinov v 2. dimenziji	20
3.2.2.6	Barvanje 2-D gelov z barvilm SYPRO RUBY	22
3.2.3	Aparature in naprave	23
3.3	METODE	25
3.3.1	Vzorci kvasne biomase	25
3.3.1.1	Priprava biomase	25
3.3.2	Priprava celičnega ekstrakta	25
3.3.2.1	Razbijanje celic kvasovk s cirkonij-kremenčevimi kroglicami	25
3.3.3	Merjenje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu	25
3.3.4	Čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu s kitom "2-D Clean Up"	26
3.3.5	Ločevanje proteinov z dvo-dimenzionalno gelsko elektroforezo	27
3.3.5.1	Ločevanje proteinov v 1. dimenziji	27
3.3.5.1.1	Priprava vzorcev za nanos na trakove IPG	27
3.3.5.1.2	Rehidracija trakov	28
3.3.5.1.3	Izoelektrično fokusiranje - IEF	28
3.3.5.2	Ločevanje proteinov v 2. dimenziji	29
3.3.5.2.1	Vlivanje gelov	29
3.3.5.2.2	Uravnoteženje trakov IPG	29
3.3.5.2.3	Prenos trakov IPG na ločilni gel	30
3.3.5.2.4	SDS-PAGE	30
3.3.6	Barvanje 2-D gelov z barvilm SYPRO RUBY	30

3.3.7	Slikanje gelov in pregled rezultatov	31
3.3.7.1	Slikanje gelov	31
3.3.7.2	Analiza slik	31
3.3.7.3	Statistična analiza spremembe proteoma	33
3.3.8	Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo	33
3.3.9	Obdelava podatkov z bioinformacijskimi orodji	33
4	REZULTATI	34
5	RAZPRAVA	46
6	SKLEPI	51
7	POVZETEK	52
8	VIRI	54

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Vzorci kvasne biomase za analizo proteinov.....	18
Preglednica 2: Sestava ekstrakcijskega pufra.....	18
Preglednica 3: Sestava osnovne raztopine za rehidracijo.....	19
Preglednica 4: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida.....	21
Preglednica 5: Sestava osnovnega pufra za uravnoteženje	21
Preglednica 6: Sestava agarozne raztopine	22
Preglednica 7: Sestava 1x SDS elektroforeznega pufra	22
Preglednica 8: Sestava fiksacijske raztopine	22
Preglednica 9: Sestava raztopine za razbarvanje	23
Preglednica 10: Postopek barvanja gelov.....	31
Preglednica 11: Identifikacija diferencialno izraženih proteinov celičnega ekstrakta pivske kvasovke <i>Saccharomyces pastorianus</i> v različnih šaržah fermentacije.....	41

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema postopka proizvodnje piva (Encyclopædia Britannica, 2010).....	4
Slika 2: Pregled metabolnih aktivnosti kvasovke <i>Saccharomyces pastorianus</i> , ki vplivajo na kakovost piva. Poenostavljen shematski prikaz povzema glavne metabolne poti povezane z razvojem značilnega okusa in arome piva s strani kvasovke (Bokulich in Bamforth, 2013).....	9
Slika 3: Shematski prikaz časovne in stopenske izpostavljenosti kvasovk možnim stresnim dejavnikom med fermentacijo (Gibson in sod., 2007).....	11
Slika 4: Shematski prikaz poteka dela	17
Slika 5: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu	26
Slika 6: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise s programom 2-D Dymension	32
Slika 7: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke <i>Saccharomyces pastorianus</i> tekom različnih zaporednih šarž fermentacije.	35
Slika 8: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke <i>Saccharomyces pastorianus</i> generacije 1 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali.....	36
Slika 9: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke <i>Saccharomyces pastorianus</i> generacije 8 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali.....	37
Slika 10: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke <i>Saccharomyces pastorianus</i> generacije 12 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali.....	38
Slika 11: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke <i>Saccharomyces pastorianus</i> generacije 14 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali.....	39
Slika 12: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke <i>Saccharomyces pastorianus</i> generacije 15 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali.....	40
Slika 13: Prikaz glikolize in alkoholne fermentacije pri pivski kvasovki <i>Saccharomyces pastorianus</i> z označenimi identificiranimi proteini.....	43
Slika 14: Prikaz spremjanja razmerja seštevka normaliziranih volumnov posameznih oblik Enol po generacijah glede na referenco (generacija 1).....	44

Slika 15: Prikaz spremjanja razmerja seštevka normaliziranih volumnov posameznih oblik Eno2 po generacijah glede na referenco (generacija 1)..... 45

Slika 16: Prikaz spremjanja razmerja seštevka normaliziranih volumnov posameznih oblik Adh4 po generacijah glede na referenco (generacija 1)..... 45

KAZALO PRILOG

Priloga A: Prikaz ravni izražanja celokupnih proteinov vzorcev pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* glede na generacijo 1 (referenca) skupaj z rezultati statistične analize sprememb proteoma (Studentov t-test)

Priloga B: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 1 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov

Priloga C: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 8 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov

Priloga D: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 12 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov

Priloga E: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 14 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov

Priloga F: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 15 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov

Priloga G: Prikaz identificiranih totalnih proteinov vzorcev pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* glede na glavno pot, v kateri so udeleženi in njihove ostale vloge

Priloga H: Grafični prikaz sistematske klasifikacije identificiranih proteinov glede na encimski razred, če encime z večimi izoblikami upoštevamo le enkrat

Priloga I: Prikaz normaliziranih volumnov Eno1 po generacijah

Priloga J: Prikaz normaliziranih volumnov Eno2 po generacijah

Priloga K: Prikaz normaliziranih volumnov Adh4 po generacijah

Priloga L: Prikaz sprememb identificiranih 2-D lis po generacijah

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2-D	dvo-dimenzionalen
2-DE	dvo-dimenzionalna elektroforeza
A ₅₉₅	absorbanca ($\lambda=595$ nm)
AAT	aspartat aminotransferaza
Act1	aktin
Adh4	alkohol dehidrogenaza
ADP	adenozin difosfat
AK	amino kislina
APS	amonijev persulfat
Asc1	gvanin nukleotid vezavna proteinska podenota beta
ATP	adenozin trifosfat
BFM	bromfenol modro
BSA	goveji serumski albumin (<i>ang. bovine serum albumin</i>)
c	koncentracija
C:N razmerje	razmerje med ogljikom in dušikom
CHAPS	3-[<i>(3-kolamidopropil)dimetilamonio</i>]-1-propan-sulfonat (<i>ang. 3-[<i>(3-cholamidopropyl)dimethylammonio</i>]-1-propane-sulfonate</i>)
Co-A	koencim A
ddH ₂ O	bidestilirana voda
dH ₂ O	destilirana voda
DMS	dimetilsulfid
DMSO	dimetil sulfoksid (<i>ang. dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	ditiotreitol
Eno1, Eno2	enolaza
ER	endoplazemski retikulum
Fba1	fruktoza-bifosfat aldolaza
g	gravitacijski pospešek [m/s^2]
Gpm1	fosfoglicerat mutaza
Gpp1	glicerol-1-fosfat fosfohidrolaza
GSR	splošen (ali globalni) stresni odziv (<i>ang. general stress response</i>)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
H ₂ S	vodikov sulfid
HSF	faktorji transkripcije toplotnega šoka (<i>ang. heat shock transcription factors</i>)
Hsp	proteini toplotnega šoka (<i>ang. heat shock proteins</i>)

HSR	odziv topotnega šoka (<i>ang. heat shock response</i>)
Hxk	heksokinaza
IEF	izoelektrično fokusiranje
IP	inhibitor proteaz
IpdC	indolpiruvat dekarboksilaza
IPG	imobiliziran pH gradient
IUBMB	Mednarodna zveza za biokemijo in molekularno biologijo (<i>ang. International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)
JAA	jodacetamid
kDa	kilodalton
KEGG	Kjotska enciklopedija genov in genomov (<i>ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
mA	miliamper
MALDI-TOF	ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem (MALDI) in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (TOF) (<i>ang. matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>)
mRNA	informacijska RNA (<i>ang. messenger RNA</i>)
MS	masna spektrometrija
mtDNA	mitohondrijska DNA (<i>ang. mitochondrial DNA</i>)
MW	molekulska masa (<i>ang. molecular weight</i>) [Da]
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
O ₂ ^{•-}	superoksidni radikal
OH	ogljikovi hidrati
OH [•]	hidroksilni radikal
p	Studentov t-test
Pdc1	piruvat dekarboksilaza
PE	ekstrakcijski pufer
Pfk	fosfofruktokinaza
Pgi	glukoza-6-fosfat izomeraza
Pgk1	fosfoglicerat kinaza
pH	negativni dekadični logaritem koncentracije vodikovih ionov
Pi	fosfat
pI	izoelektrična točka
PM	število ujemanih peptidov najvišjega zadetka
POF1	nikotinamid mononukleotid adeniltransferza
R	razmerje vrednosti normaliziranih volumnov

RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (<i>ang. restriction fragment length polymorphism</i>)
RNA	ribonukleinska kislina (<i>ang. ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (<i>ang. reactive oxygen species</i>)
RP	raztopina za rehidracijo trakov
Rps0A	ribosomska 40S podenota proteina S0A
SC	odstotek v pokritosti aminokislinske sekvene ujemanih peptidov v identificiranem proteinu
SDS	natrijev dodecil sulfat (<i>ang. sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (<i>ang. sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SO_4^{2-}	sulfat
βG	β -glikozidaza
Tdh3	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
TEMED	tetrametiletilendiamin (<i>ang. tetramethylethylenediamine</i>)
Tpi1	trioza-fosfat izomeraza
TPP	tiamin pirofosfat
Tris-HCl	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol, vodikov klorid (<i>ang. 2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol, hydrogen chloride</i>)
UV	ultravijolično valovanje
v/v	mL/100 mL
V_N	normaliziran volumen
VRT./min	vrtljaji na minuto
w/v	g/100 mL
YNL209W	protein toplotnega šoka Ssb2

1 UVOD

Zametki proizvodnje piva segajo 6000 let nazaj v preteklost, ko so v Sumeriji začeli pridelovati ječmen. V Evropi se je pivovarstvo postopoma razvilo v srednjem veku s proizvodnjo piva ale. Proizvodnja piva lager se je začela v 15. stoletju na Bavarskem in svoj razcvet doživela v 19. stoletju. Za razliko od piva ale gre pri tej tehniki za počasno, nizko-temperaturno fermentacijo, ki jo izvajajo kriotolerantni sevi pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* (imenovana tudi *Saccharomyces carlsbergensis*) (Libkind in sod., 2011). Gre za hibrid dveh vrst z različnimi lastnostmi in sicer seva *Saccharomyces cerevisiae* in seva druge vrste, najverjetneje *Saccharomyces bayanus* (Rainieri in sod., 2006). Hibridna narava sevu omogoča izredno prilagodljivost, a hkrati prinaša genomsko nestabilnost, ki lahko negativno vpliva na uspešnost fermentacije (Smart, 2007).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Med fermentacijo je kvasovka izpostavljena hudim stresnim razmeram okolja, ki se med samim procesom stalno spreminja (Smart, 2007). Proizvodni sevi se morajo odzvati na nihanja koncentracije raztopljenega kisika, pH, osmolarnosti, koncentracije etanola, oskrbe s hrани in temperaturna nihanja (Gibson in sod., 2007). Pred fermentacijo kvasovke hranijo pri visoki celični gostoti in praktično brez hrani. Nato kvasovke prenesajo v svežo pivino, ki zaradi vsebnosti približno 100 g/L ogljikovih hidratov, celicam predstavlja velik osmotski stres. Z napredovanjem procesa se postopoma pojavljajo nove oblike stresa - izčrpanje hrani in povečane koncentracije alkohola, poleg tega pa se med zorenjem piva temperatura zniža iz 11-14 °C na 7-8 °C (Olesen in sod., 2002). Zmogljivost fermentacije pivskih kvasovk je tako odvisna od njihove sposobnosti prilagajanja na te spremembe, zlasti v šaržnem procesu fermentacije, ki vključuje recikliranje (ponovno nacepitev) ene same kvasne kulture (gošče) že vrsto fermentacij (generacij) (Gibson in sod., 2007).

Do sedaj je večina študij obsegala raziskovanje genov in proteinov kvasovk v različnih fazah rasti tekom fermentacije (Brejning in sod., 2005) oziroma primerjala izražanje delov genoma, ki izvirajo iz *S. cerevisiae* in tistih, ki ne (Caesar in sod., 2007). V pričujočem delu smo se posvetili analizi sprememb pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* na ravni proteoma tekom zaporednih šarž fermentacije in poskusili ugotoviti kakšne so morebitne spremembe v izražanju proteinov ter kdaj do teh sprememb pride.

1.2 CILJI NALOGE

- spremljati proteinski profil pivske kvasovke vrste *Saccharomyces pastorianus* tekom zaporednih šarž fermentacij in določiti identiteto diferencialno izraženih proteinov.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da:

- se bo proteinski profil pivske kvasovke vrste *Saccharomyces pastorianus* tekom zaporednih šarž fermentacij spremenjal,
- bodo diferencialno izraženi proteini primerni biomarkerji za sledenje uspešnosti fermentacije v zaporednih šaržah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROIZVODNJA PIVA

2.1.1 Pivovarstvo skozi čas

Šele leta 1860 je Louis Pasteur v svojem delu z naslovom *Mémoire sur la fermentation alcoolique* razkril, da kvasovke, v procesu imenovanem fermentacija, pretvarjajo sladkor v etanol in ogljikov dioksid (Pasteur, 1860). In čeprav ljudje v antičnih časih niso razumeli tega biokemijskega procesa, so fermentacijo tisoče let uporabljali kot učinkovit način ohranjanja kakovosti in varnosti živil ter pijač (Sicard in Legras, 2011).

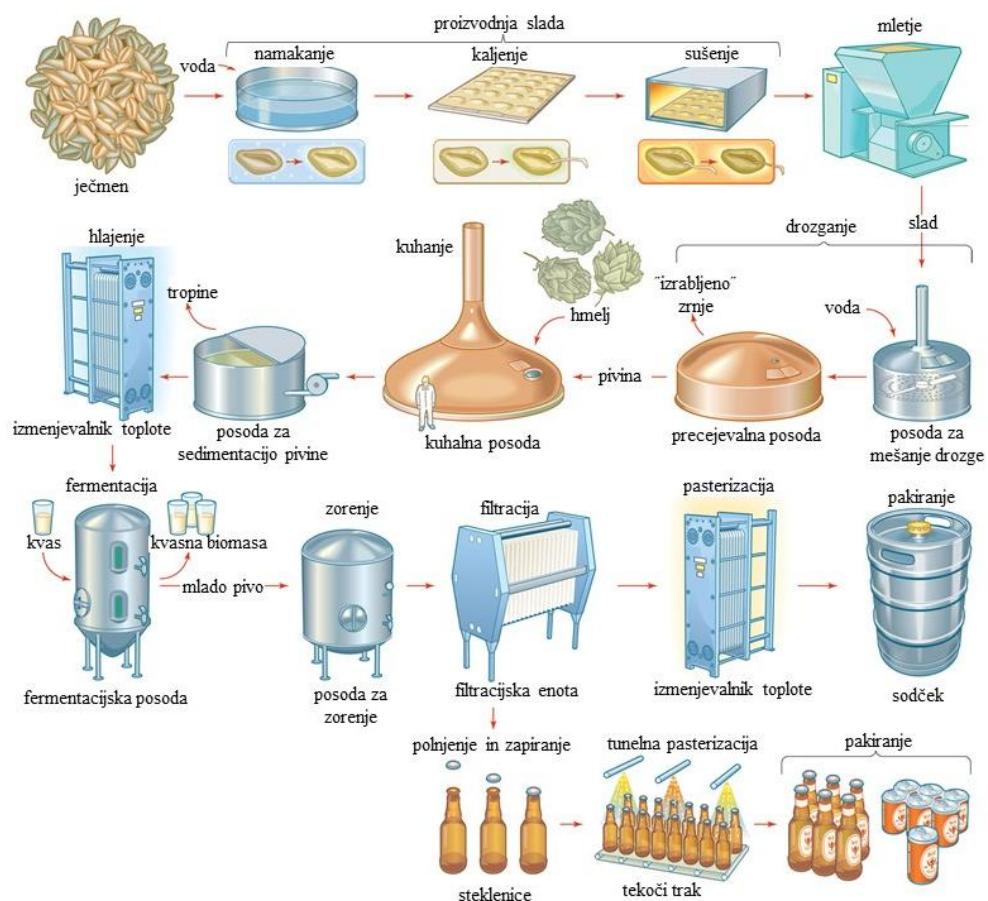
Proizvodnja fermentiranih pijač iz ječmena izvira iz Sumerije in sega v pozno 4. stoletje pr.n.št. Pivo je v pisnih virih prvič omenjeno v himni Ninkasi, mezopotamski boginji piva, ki je hkrati služila kot recept za izdelavo piva (Hornsey, 2013). Himna pripoveduje, kako Ninkasa vari pivo bogovom: speče kaleči ječmen, zmeša slad s sladkimi dišavnicami in prelije dišeče pivo v posodo (Civil, 1964).

V Starem Egiptu so za varjenje piva uporabljali piro in ječmen, bodisi samostojno ali skupaj (Samuel, 1996). Sprva so bili raziskovalci mnenja, da so pivo proizvajali iz kvasnega testa tako, da so kruh iz grobo mletega ječmena delno spekli, ga razdrobili in z vodo precedili skozi sito, kjer je prišlo do fermentacije ob delovanju kvasovk iz kruha (Faltings, 1991). Vendar analize ostankov piva iz obdobja 1500-1300 pr.n.št. nakazujejo, da so zmes grobo mletega kuhanega in nekuhanega sladu ter vode prelili skozi sito, čemur je sledil proces fermentacije, ki pa še ni povsem razjasnjen. Do fermentacije je lahko prišlo spontano, možna pa je tudi inokulacija s starter kulturo iz predhodnih šarž (Samuel, 1996; Tamang in Samuel, 2010).

Proces proizvodnje piva se je s pomočjo trgovcev razširil tudi izven meja Bližnjega vzhoda. Rimljani so pivo odkrili leta 55 pr.n.št., ko je Julij Cezar napadel Britanske otoke. V srednjem veku so pivo varili predvsem menihi, ki so veliko pozornosti posvetili izboljšanju kakovosti končnega produkta. Menihi na Bavarskem so leta 736 odkrili, da hmelj vsebuje do tedaj še neznane snovi, ki izboljšajo okus in obstojnost piva. Poleg tega so odkrili, da nekatere kvasovke med fermentacijo potonejo na dno ter, da je tako pridelano pivo bolj stabilno kot pivo varjeno s kvasovkami, ki med fermentacijo splavajo na površje. Ta spoznanja predstavljajo začetke proizvodnje piva lager (Hornsey, 2013), ki je svoj razcvet doživel v 19. stoletju (Libkind in sod., 2011).

2.1.2 Proizvodnja piva kot jo poznamo danes

Pojem pivovarstvo opisuje proizvodnjo alkoholnih pijač v procesu fermentacije iz slajenega zrnja (Madigan in sod., 2009), pri čemer kvasovke delež ogljikovih hidratov pretvorijo v etanol in ogljikov dioksid (Hornsey, 2013). Tehnologija piva je razdeljena v tri faze: proizvodnjo slada, proizvodnjo pivine in fermentacijo z zorenjem.



Slika 1: Shema postopka proizvodnje piva (Young, 2015)

2.1.2.1 Proizvodnja slada

Prva stopnja proizvodnje slada je namakanje in pranje ječmena, s čimer dosežemo 43-46 % navlaženje semen, sproščanje hormonov kaljenja (giberelinov) (Bamforth, 2006) in odstranitev nečistoč, fenolnih komponent ovoja, topnih organskih snovi in mikroorganizmov (O'Toole in Lee, 2006). Sledi kaljenje v kalilnici, 3-6 dni pri 16-20 °C (Bamforth, 2006), pri katerem pride do sinteze encimov (α - in β -amilaz, proteaz, β -glukanaz) (O'Toole in Lee, 2006).

Zadnja stopnja je sušenje, pri katerem kaleči ječmen prepihajo z vročim zrakom, s čimer se ustavi rast rastline, ohrani pa encimska aktivnost semena (Hough, 1985). Pri tem slad dobi specifičen okus in aroma (O'Toole in Lee, 2006). Posušen slad pred skladiščenjem spolirajo (odstranijo kalčke in koreninice) in ga skladiščijo 4-6 tednov (Briggs in sod., 2004). Slad pred nadaljnjo uporabo zmeljejo in s tem pospešijo encimsko razgradnjo škroba do enostavnih sladkorjev (Hornsey, 2013).

2.1.2.2 Proizvodnja pivine

Druga faza je proizvodnja pivine ali varjenje, v kateri slad in druge škrobne vire (nadomestke) pripravijo za proces fermentacije. Zmlet slad in nadomestke zmešajo z vodo in inkubirajo v drozgalni kadi: najprej 30 min pri 40 °C (poteče proteoliza) in nato 30 min pri 70 °C in pH med 5,1 in 5,2 (poteče razgradnja škroba) (Ayres in sod., 1981). Pivino (tekoč del drozge) prefiltirajo in odstranijo "izrabljeno" zrnje. Sledi dodatek hmelja, ki vsebuje grene snovi (polifenole) in olja, ki prispevajo k okusu in stabilnosti piva (O'Toole in Lee, 2006). Pivino na koncu zavrejo (45-120 min) (Hornsey, 2013) in jo s tem sterilizirajo in skoncentrirajo, inaktivirajo encime (MacLeod, 1977), koagulirajo proteine in tanine (Hough, 1985), poleg tega pa poteče ekstrakcija olj in polifenolov iz hmelja (Hornsey, 2013) ter evaporacija neželenih hlapnih snovi (MacLeod, 1977). Pred fermentacijo pivini odstranijo ostanke hmelja in jo ohladijo na ustrezno temperaturo, odvisno od tipa piva: 10-15 °C za pivo lager in 15-20 °C za pivo ale (Briggs in sod., 2004).

2.1.2.3 Fermentacija

Naslednja stopnja procesa je fermentacija z zorenjem. Prisotnost kisika ob inokulaciju starter kulture je ključna za hitro celično rast, poleg tega kvasovke pred anaerobno rastjo potrebujetejo molekularni kisik za sintezo maščobnih kislin in sterolov, ki so esencialni gradniki membrane (Boulton in Quain, 2001; O'Toole in Lee, 2006; Hornsey, 2013). Kmalu se vzpostavijo anaerobni pogoji in začne se pretvorba sladkorjev v etanol in ogljikov dioksid. Čeprav je etanol glavni metabolni produkt, pa le-ta nima velikega vpliva na okus in aroma piva (Hornsey, 2013). Med fermentacijo namreč nastanejo tudi drugi metabolni produkti, kot so višji alkoholi (propanol, izobutanol, izoamil alkohol), estri (etyl acetat, izoamil acetat, fenil etil acetat) in organske kisline (acetat, laktat, sukcinat) (Willaert, 2007), ključni komponenti arome in okusa pa sta diacetil in 2,3-pentandion, ki dajeta pivu maslen, karamelni okus (Hornsey, 2013). Med zorenjem se okus spreminja – pride do zmanjšanja koncentracije vodikovega sulfida, acetaldehida, diacetila in drugih nezaželenih okusov (O'Toole in Lee, 2006), poleg tega pa tudi do stabilizacije in zbistritve (sedimentacija kvasovk) piva (Hornsey, 2013).

2.1.3 Osnovne surovine za proizvodnjo piva

Ključnega pomena pri varjenju dobrega piva so kakovostne surovine. Osnovo pri proizvodnji piva običajno predstavljajo naravne surovine: voda, ječmen, hmelj in kvasovke. Mnogi pivovarji pa poleg tega uporabljajo tudi različne dodatke (Lewis in Young, 2001).

2.1.3.1 Voda

Voda je primarna surovina v pivovarstvu, saj predstavlja približno 95 % vsebine piva (Hough, 1985), poleg tega pa je pomembna tudi za sam proces (čiščenje, spiranje in sterilizacija) (van der Merwe in Friend, 2002). Kakovost vode vpliva na kakovost piva (Pires in Brányik, 2015) in mora zadostiti standardom glede neoporečnosti, tako mikrobiološke kot tudi kemijске (Boulton in Quain, 2001). Vodi predhodno odstranijo neraztopljene snovi, odpravijo mikrobno kontaminacijo in zmanjšajo vsebnost neželenih mineralov (Pires in Brányik, 2015). Varjenje različnih vrst piva namreč zahteva vodo z ustrezno ionsko jakostjo (Boulton in Quain, 2001).

2.1.3.2 Ječmen in njegovi nadomestki

Ječmen (*Hordeum vulgare*) je najpogostejsa izbira za pripravo slada (Briggs in sod., 2004). V glavnem se uporablja dve vrsti ječmena: dvo-redni in šest-redni ječmen. Dvo-redni ječmen ima večja zrna in večjo vsebnost škroba, medtem ko šest-redni vsebuje manj škroba (Pires in Brányik, 2015), a ima večjo vsebnost proteinov in višjo raven β -glukana (O'Toole in Lee, 2006). Dvo-redni ječmen je dobra izbira, če želimo povečati delež ekstrakta, v primeru, da želimo povečati encimsko delovanje, pa bo primernejša izbira šest-redni ječmen (Pires in Brányik, 2015). Prednosti ječmena pred drugimi škrobnimi viri so tudi manjša dovzetnost za kontaminacijo s plesnimi, prisotnost luščine, ki predstavlja dober filter pri odstranjevanju pivine, poleg tega je temperatura zaklejitve škroba (52-59 °C) nižja od temperature inaktivacije α -amilaz (MacLeod, 1977).

Poleg ječmena pa lahko uporabimo tudi druge vire škroba (nadomestke): neslajan ječmen, pšenica, riž, koruza, sirek in drugi viri ogljikovih hidratov, kot so škrob, saharoza, glukoza ter različni sirupi. Z njihovo uporabo znižamo končne stroške proizvodnje ter izboljšamo barvo in okus/aromo piva (Pires in Brányik, 2015).

2.1.3.3 Hmelj

Pivovarji uporabijo neoplojene ženske cvetove (storžke) hmelja (*Humulus lupulus*), ki vsebujejo grenkobne smole in esencialna olja. Ti prispevajo k edinstveni grenkosti in okusu piva (O'Toole in Lee, 2006). Poleg tvorbe netopnih kompleksov s proteini in polipeptidi, ki

prispevajo h koloidni stabilnosti pivine, hmelj sterilizira pivino in skrbi za bakteriološko stabilnost piva (De Keukeleire, 2000). Izo- α -kisline hmelja namreč delujejo protimikrobnno (Hornsey, 2013). Flavonoidi prisotni v hmelju pa imajo tudi antioksidativne lastnosti (Stevens in Page, 2004).

2.1.3.4 Kvasovke

Večina pivovarjev ima svoj lasten sev kvasovke (Bamforth, 2006), ki ga izberejo na podlagi: stopnje in obsega rasti, stopnje in obsega fermentacije, okusa in arome proizvedenega piva ter njihove sposobnosti sedimentiranja oz. splavanja na površje (Briggs in sod., 2004). In kljub temu, da uradna taksonomija uvršča vse pivske kvasovke v rod *Saccharomyces*, pivovarji pogosto opredeljujejo dva tipa kvasovk (Lewis in Young, 2001):

- kvasovke ale (*Saccharomyces cerevisiae*) – gre za kvasovke zgornjega vrenja, saj po končanem procesu fermentacije splavajo na površje in jih lahko odstranimo s posnetjem. Običajno jih uporabijo pri temperaturah fermentacije med 15-17 °C ali višje, tip piva, ki pri tem nastane, imenujemo ale;
- kvasovke lager (*Saccharomyces carlsbergensis* ali *Saccharomyces pastorianus*) – gre za kvasovke spodnjega vrenja, ki se po koncu fermentacije usedejo na dno fermentorja. Uporabljam jih pri temperaturah nižjih od 15 °C za proizvodnjo piva lager. Beseda lager izvira iz nemškega glagola "lagern", ki pomeni počivati, ležati ali shraniti, saj so piva tega tipa, po končani fermentaciji shranjena, da dozori aroma in se izboljša kakovost piva (Lewis in Young, 2001; Hardwick in sod., 1995).

2.2 KVASOVKE

2.2.1 Izvor kvasovk lager *Saccharomyces pastorianus*

Kvasovka lager *Saccharomyces pastorianus* (sinonim *Saccharomyces carlsbergensis*) je alopoliploid, saj vsebuje dele dveh različnih genomov. Gre za hibrid dveh vrst, in sicer seva *Saccharomyces cerevisiae* in seva druge vrste, katerega identiteta je do danes še nerazjasnjena (Casaregola in sod., 2001). Rezultati različnih študij, katerih cilj je odkriti identitetu drugega "starša" kvasovke lager, so si namreč zelo nasprotujoči.

Preučevanje polimorfizma dolžin restriktijskih fragmentov (RFLP) kot tudi analiza sekvenč različnih genov, ki ne izvirajo iz vrste *Saccharomyces*, sta privreda do ugotovitve, da bi izvor drugega genoma kvasovke lager lahko bila kvasovka vrste *S. monacensis* (Hansen in Kielland-Brandt, 1994; Donalies in sod., 2008). Primerjava homologije DNA med *S. cerevisiae* in drugimi kvasnimi vrstami pa nakazuje, da je izvor drugega genoma kvasovka vrste *S. bayanus*

(Tamai in sod., 1998). Analiza proteomov kvasovk lager in tipskih vrst *S. bayanus*, *S. carlsbergensis*, *S. monacensis* in *S. pastorianus* z 2-D gelsko elektroforezo pa je izpostavila dejstvo, da so *S. carlsbergensis*, *S. monacensis* in *S. pastorianus* že same po sebi hibridne vrste, ki prav tako vsebujejo *S. cerevisiae*-podobne proteine. To sicer razloži delno homologijo kvasovke lager s kvasovko *S. monacensis*, ne pa tudi prej omenjene delne homologije s kvasovko *S. bayanus* (Donalies in sod., 2008).

Nedavne raziskave nakazujejo, da gre pri kvasovki *S. carlsbergensis* celo za triploidno vrsto, ki nosi haploidni genom *S. cerevisiae* in diploidni genom *S. eubayanus*, pri kvasovki *S. pastorianus* pa za tetraploidno vrsto, katere genom sestavlja po dva diploidna genoma *S. cerevisiae* in *S. eubayanus* (Walther in sod., 2014).

Ne glede na izvor kvasovke pa je jasno, da njena hibridna narava sevu omogoča izredno prilagodljivost, a hkrati prinaša genomske nestabilnosti, ki lahko negativno vpliva na uspešnost fermentacije (Smart, 2007).

2.2.2 Prednosti kvasovk *Saccharomyces pastorianus* pred kvasovkami ale

Obstaja več bioloških lastnosti, ki so značilne za kvasovke lager, kot je ustreznost stopnja in časovni okvir flokulacije (Zheng in sod., 1994; Boulton in Quain, 2001). Nezadostna flokulacija se odraža v slabšem usedanju kvasovk in posledično v pomanjkanju gošče za ponovno nacepitev, hkrati pa ostane v pivu nesprejemljivo veliko število kvasnih ostankov. V primeru prehitre flokulacije, v pivini primankuje celic, kar se odraža na kakovosti piva (Briggs in sod., 2004).

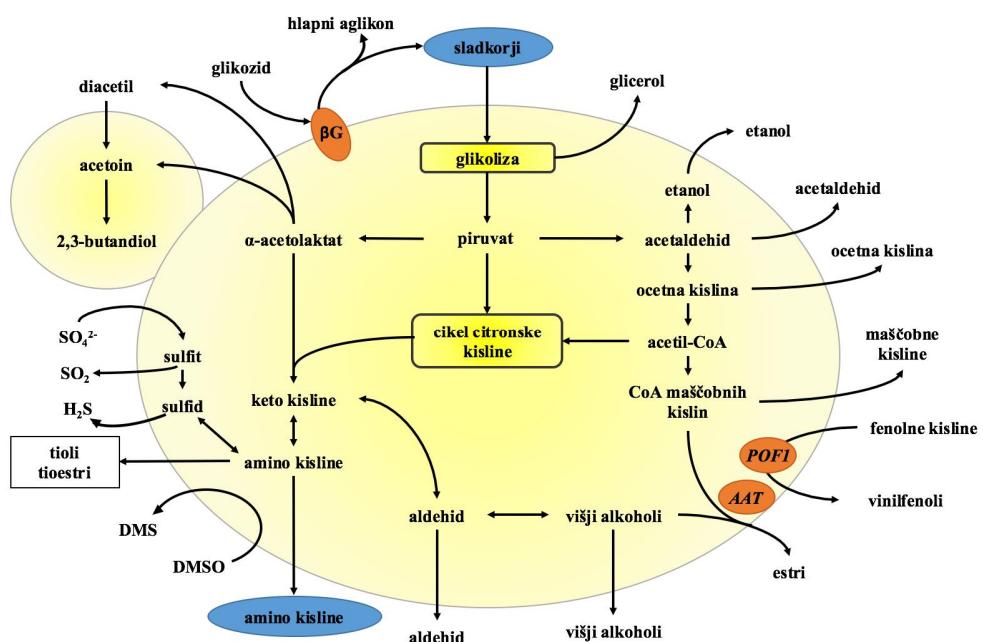
Pomembna lastnost kvasovk lager je tudi učinkovita sposobnost asimilacije maltoze in maltotrioze pri nizki temperaturi (npr. 5-14 °C) (Zheng in sod., 1994; Boulton in Quain, 2001). Maltoza in maltotriosa skupaj predstavlja približno 80 % vseh fermentabilnih sladkorjev v pivini, zato je učinkovita asimilacija le-teh ključna za hitro in celovito fermentacijo (Jespersen in sod., 1999; Vidgren in sod., 2010).

Druga značilnost kvasovk lager pa je sposobnost proizvajanja velikih količin sulfitonov, ki so z več vidikov pomembni za stabilnost okusa, vključno z antioksidativno aktivnostjo (Crumplen in sod., 1993).

2.3 METABOLITI KVASOVK MED FERMENTACIJO PIVA

Med procesom fermentacije kvasovke proizvajajo široko paleto aromatičnih snovi (Slika 2), ki močno vplivajo na zapleten okus fermentiranih alkoholnih pijskih. Kljub temu, da so ti

sekundarni metaboliti prisotni le v zelo majhnih količinah, pa njihove koncentracije določajo izrazito in prepoznavno aroma alkoholnih pijač (Verstrepen in sod., 2003).



Slika 2: Pregled metabolnih aktivnosti kvasovke *Saccharomyces pastorianus*, ki vplivajo na kakovost piva. Poenostavljen shematski prikaz povzema glavne metabolne poti povezane z razvojem značilnega okusa in arome piva s strani kvasovke. DMS – dimetilsilfid; DMSO – dimetilsulfoksid; β G – β -glikozidaza; AAT – aspartat aminotransferaza; POF1 – nikotinamid mononukleotid adeniltransferza (Bokulich in Bamforth, 2013)

2.3.1 Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija je ključen proces proizvodnje piva. Pri tem kvasovke pretvarjajo glukozo v etanol in CO_2 . Glavna metabolna pot, vpletena v alkoholno fermentacijo, je glikoliza (Embden-Meyerhof-Parnas-ova pot). V procesu glikolize iz ene molekule glukoze nastaneta dve molekuli piruvata, le-ta pa se v dvo-stopenjskem procesu pretvori v etanol in CO_2 (Nelson in Cox, 2000; Bai in sod., 2008). V prvem koraku pride do dekarboksilacije piruvata v irreverzibilni reakciji, ki jo katalizira piruvat dekarboksilaza. Dekarboksilacija poteče ob prisotnosti Mg^+ in tiamin pirofosfata (TPP). V drugem koraku pa alkohol dehidrogenaza reducira acetaldehid do etanola ob pomoči NADH, ki priskrbi redukcijsko moč. Končna produkta alkoholne fermentacije sta etanol in CO_2 (Enačba 1) (Nelson in Cox, 2000).



2.3.2 Drugi metabolni produkti

Aktivne snovi prepoznavnega okusa in arome piva, ki jih proizvajajo kvasovke med procesom fermentacije, lahko razdelimo v pet glavnih skupin: žveplo vsebujoče molekule, organske kisline, višje alkohole, karbonilne spojine in hlapne estre. Izmed naštetih spojin hlapni estri predstavljajo največjo in najpomembnejšo skupino. Odgovorni so namreč za močno zaželen sadni značaj piva (Verstrepen in sod., 2003).

Najpomembnejši estri za značilno aromo piva so acetatni estri, kot so etil acetat (aroma topil), izoamil acetat (okus po banani) in fenil acetat (cvetlična aroma, po vrtnicah). Prav tako pomembni so etil estri srednje razvejanih maščobnih kislin, kot sta etil kaproat in etil kaprilat, ki imata nekoliko kiselkasto aromo po jabolku in lepo zaokrožita celotno aromo piva (Verstrepen in sod., 2003).

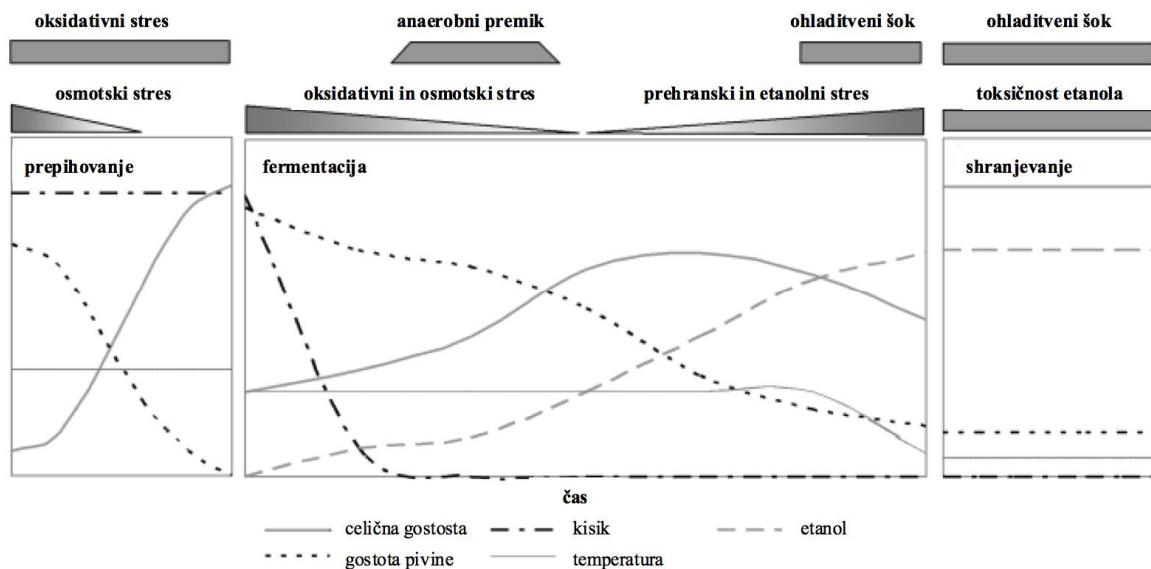
Pomembni komponenti arome in okusa sta tudi diacetil in pentandion, ki dajeta pivu večinoma nezaželen maslen okus, okus po medu. Nastaneta z neencimsko razgradnjo acetolaktata in acetohidroksibutirata, ki sta intermediata v presnovni poti sinteze amino kislin. Kvasovke med procesom zorenja piva, diacetil in pentandion encimatsko razgradijo v butandiol in pentandion (Bokulich in Bamforth, 2013).

Proizvodnja SO_2 ni pomembna le zaradi neposrednega vpliva na aromo piva, pač pa tudi zaradi vloge pri zaščiti pred kvarom piva. Poleg tega ima SO_2 antioksidativne in protimikrobne lastnosti, zaradi katerih deluje kot učinkovit konzervans (Ilett, 1995).

Raven posameznega metabolita v različnih tipih piva variira in je delno odvisna od seva kvasovk, prav tako pomembni dejavniki pa so tudi pogoji fermentacije, temperatura, vsebnost dodanega kisika, C:N razmerje, trajanje fermentacije in zorenje piva (Bokulich in Bamforth, 2013).

2.4 IZPOSTAVLJENOST KVASOVK *Saccharomyces pastorianus* STRESNIM RAZMERAM MED FERMENTACIJO

Za učinkovito varjenje piva so potrebni pogoji, ki zagotavljajo proizvodnjo kakovostnega piva in hkrati ohranjajo vitalnost kvasovk. Med fermentacijo so kvasovke izpostavljene številnim stresnim dejavnikom (Slika 3). Odzvati se morajo na nihanja v koncentraciji raztopljenega kisika, pH, osmolarnosti, koncentraciji etanola, dostopnosti hrani in temperaturna nihanja. Uspešnost fermentacije je zato odvisna od njihove sposobnosti prilagajanja na te spremembe, zlasti v šaržni proizvodnji, pri kateri isto kvasno kulturo ponovno nacepijo skozi več šarž fermentacij (Gibson in sod., 2007).



Slika 3: Shematski prikaz časovne in stopenjske izpostavljenosti kvasovk možnim stresnim dejavnikom med fermentacijo (Gibson in sod., 2007)

2.4.1 Stresni odziv

Pri kvasovkah poznamo dve glavni poti odzivanja na stres. Prva pot je odziv toplotnega šoka (ang. *heat shock response* – *HSR*), ki ga uravnavajo tako imenovani faktorji transkripcije toplotnega šoka (ang. *heat shock transcription factors* - *HSF*) aktivirani s toplotnim stresom (Morimoto in sod., 1996; Chatterjee in sod., 2000). Druga možnost pa je splošen (ali globalni) stresni odziv (ang. *general stress response* – *GSR*), ki ga aktivirajo številni okoljski stresni dejavniki, vključno z oksidativnim, pH, toplotnim in osmotskim stresom ter pomanjkanjem virov dušika. Splošni stresni odziv naj bi bil del evolucijske prilagodljivosti, ki kvasovkam omogoča odziv na neugodne okoljske razmere, da bi s tem ohranile celično viabilnost (Ruis in Schuller, 1995; Martinez-Pastor in sod., 1996; Schmitt in McEntee, 1996).

2.4.2 Oksidativni stres

Molekularni kisik (O_2) je potreben za sprostitev energije med aerobnim dihanjem, vendar pri tem nastanejo derivati kisika, ki jih s skupnim izrazom imenujemo reaktivne kisikove zvrsti (ROS). Najpomembnejše ROS so superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) in hidroksilni radikal ($OH^{\cdot-}$), ki lahko poškodujejo sestavne dele celic, prispevajo k celičnemu staranju in nenazadnje privedejo do celične smrti (Beckman in Ames, 1998). Vplivajo lahko na peroksidacijo lipidov (Girotti, 1998), inaktivacijo proteinov (Cabiscool in sod., 2000) in poškodbe nukleinskih kislin (Salmon in sod., 2004).

Kisik je nujen pri razmnoževanju kvasovk in zgodnji fazi fermentacije. S tem pridobimo kvasno biomaso in zagotovimo, da so kvasovke v optimalni fiziološki kondiciji za učinkovito fermentacijo (Hulse, 2003). Problem se pojavi predvsem pri ponovnem nacepljanju iste biomase vrsto fermentacij, saj so ROS primarni vzrok staranja celic in posledično slabšanja njihove fermentativne učinkovitosti skozi generacije (Gibson in sod., 2007).

Pomembnost oksidativnega stresa za celico ponazarja število in raznolikost antioksidativnih molekul, ki jih sintetizira kvasovka *S. cerevisiae* (Dawes, 2004). Ena izmed pomembnejših je trehaloza, saj poveča stabilnost membrane (Masure in sod., 1994) in encimov (Sola-Penna in Meyer-Fernandes, 1998), zagotavlja pravilno zvijanje (Singer in Lindquist, 1998) in popravilo proteinov (Simola in sod., 2000), poleg tega pa je dodatni vir ogljika med stradanjem celic (Panek, 1963).

Kvasovke kopičijo trehalozo tudi kot odgovor na topotni šok (Hottiger in sod., 1987), izpostavljenost strupenim kemikalijam (Attfield, 1987), etanolni stres (Masure in sod., 1994) in osmotski stres (Mackenzie in sod., 1988).

2.4.3 Osmotski stres

Osmotski stres lahko opredelimo kot vsako situacijo, kjer je neravnovesje med znotrajcelično in zunajcelično osmolarnostjo zadostno, da povzroči škodljive spremembe v fiziologiji celice. Nizek zunanji osmotski potencial vodi v hipoosmotski stres, zaradi vdora vode v celico (Gibson in sod., 2007), nasprotno pa visoke koncentracije topljenca v okolju vodijo do hiperosmotskega stresa, katerega značilnost je izguba celične vode in turgor (Blomberg in Adler, 1992).

Med varjenjem piva na kvasovke delujeta dva glavna vira osmotskega stresa. Prvi se nanaša na spiranje s kislino, s katerim pivovarji odstranijo bakterijske kontaminante (Boulton in Quain, 2001) in/ali povečajo fluidnost kvasne brozge (Gibson in sod., 2007). Pri tem so kvasovke izpostavljene vrednostim pH med 2,2-2,5 (Boulton in Quain, 2001), osmotski stres pa predstavlja obilica disociiranih H^+ ionov (Gibson in sod., 2007).

Drug vir osmotskega stresa se nanaša na procesni korak inokulacije kvasne biomase v pivino, ki je kompleksen in visoko koncentriran medij z visoko koncentracijo sladkorjev (Gibson in sod., 2007), kar se odraža na slabši viabilnosti, rasti kvasovk in izvedbi fermentacije (D'Amore in sod., 1988; D'Amore, 1992).

2.4.4 Znižanje pH

Med tipično fermentacijo piva lager se pH pivine zniža iz 5,5 na 4,1. Znižanje pH je posledica proizvodnje ogljikove kisline iz CO₂, izločanja organskih kislin in porabe puferских spojin (bazičnih amino kislin in primarnih fosfatov) iz pivine (Coote in Kirsop, 1976).

pH lahko občutno vpliva na proizvodnjo komponent okusa s strani kvasovk. Znižanje pH pivine iz pH 5,75 na 5,46 lahko povzroči zmanjšanje proizvodnje dimetil sulfida (do 50 %) (Anness in Bamforth, 1982). Nadaljnje znižanje pH iz 5,5 na 4,0 lahko kar za 4-krat poveča stopnjo pretvorbe α-acetolaktata do diacetila, ki daje pivu nezaželen maslen okus (Haukeli in Lie, 1978).

Končni pH je odvisen od puferke kapacitete pivine, začetnega pH in stopnje rasti kvasovk. Kvasovke naj bi sicer tolerirale padec pH za 1,5-2,0 enoti, vendar zadnje raziskave kažejo na določeno stopnjo občutljivosti na spremembe pH (Gibson in sod., 2007).

2.4.5 Anaerobni premik

Začetna vsebnost kisika v fermentacijski posodi je okoli 8-12 µg/mL ali več, odvisno od gostote pivine, vendar se kisik v prvih nekaj urah hitro izčrpa, kar vodi v anaerobno okolje in kopiranje CO₂ (Gibson in sod., 2007). S povečevanjem koncentracije CO₂ se zmanjšuje stopnja fermentacije, stopnja in obseg rasti kvasovk, hkrati pa se zniža tudi končni pH (Arcay-Ledezma in Slaughter, 1984). Vse to posledično vpliva na zmanjšanje končnih koncentracij številnih komponent okusa in estrov (Gibson in sod., 2007).

V primerjavi z drugimi okoljskimi dejavniki, ki kvasovki predstavljajo stres, prilagajanje na anaerobne pogoje poteka počasneje, skozi več generacij. Kar niti ni presenetljivo, glede na to, da pomanjkanje kisika samo po sebi ne predstavlja neposredne nevarnosti za preživetje kvasovk ali poškodbe celičnih komponent. Največji izzivi anaerobne rasti na fermentativnem virusu ogljika so povezani s pomanjkanjem osnovnih celičnih komponent, katerih biosinteza je pogojena z dostopnostjo molekularnega kisika, z vzdrževanjem celičnega redoks ravnotežja in z zmanjševanjem poškodb povezanih s kopiranjem anaerobnih metabolitov (Lai in sod., 2005).

2.4.6 Toksičnost etanola

Z napredovanjem fermentacije se povečuje koncentracija etanola v pivini in celice so izpostavljene vedno bolj toksičnim koncentracijam etanola. V normalnih pogojih fermentacije so končne koncentracije etanola v območju med 3-6 %, pri fermentaciji z visoko gostoto pivine pa lahko končne koncentracije dosežejo tudi >10 % (Gibson in sod., 2007).

Toksični učinki etanola na fiziologijo kvasovk so zelo raznoliki. Poleg poškodb celične membrane, neželeni vplivi vključujejo tudi zaviranje rasti (Canetta in sod., 2006), zmanjšanje viabilnosti, zmanjšanje respiracije in privzema glukoze (Pascual in sod., 1988), zmanjšanje fermentacije (Fernandes in sod., 1997), inaktivacijo encimov, spremembe lipidov (Mizoguchi in Hara, 1997) in povečano prepustnost membrane (Marza in sod., 2002). Kot odziv na povečane koncentracije etanola kvasovka poveča delež nenasičenih maščobnih kislin in posledično se poveča fluidnost membrane (Lloyd in sod., 1993; Alexandre in sod., 1994).

2.4.7 Pomanjkanje hranil

Pivina je kompleksno gojišče, sestavljeno v glavnem iz ogljikovih hidratov (pribl. 90 % suhih snovi pivine) in snovi, ki vsebujejo dušik (pribl. 5 % suhih snovi pivine), prav tako pa vsebuje tudi fosfate, anorganske ione, lipide, organske kisline, polifenole in derivate nukleinskih kislin (Briggs in sod., 2004). Medtem ko je sestava pivine zelo spremenljiva, osnovne značilnosti ostajajo enake. Poglavitni ogljikovi hidrati so trisaharid maltotriosa (pribl. 15 %), disaharida maltoza (45-65 %) in saharoza (pribl. 5 %) ter monosaharida glukoza in fruktoza (pribl. 10 %). Manjši delež pa predstavljajo nefermentabilni sladkorji, pretežno dekstrini (20-30 % deleža ogljikovih hidratov) (MacWilliam, 1968).

Dušikove spojine vključujejo proteine, peptide, vrsto amino kislin (Yokoi in sod., 1988) kot tudi nukleinske kisline in njihove razgradne produkte (Boulton in Quain, 2001). Sestava dušikovih spojin v pivini je odvisna od številnih dejavnikov, vključno s sorte ječmena, pogoji slajenja in drozganja slada ter dodajanja drugih virov škroba (O'Connor-Cox in Ingledew, 1989).

Kvasovke se na pomanjkanje fermentativnih sladkorjev in asimilativnih dušikovih spojin odzovejo tako, da vstopijo v stacionarno fazo rasti in prenehajo z razmnoževanjem. Ko izčrpajo vir sladkorjev, so celice izpostavljeni diavksičnemu premiku in posledično zmanjšanju rasti, saj se celični metabolizem prilagodi na izkoriščanje nefermentativnih virov ogljika, kot je etanol (Gibson in sod., 2007).

Je pa pomanjkanje hranil in prehod v stacionarno fazo rasti ključno za začetek flokulacije kvasovk, saj imajo fermentativni sladkorji zaviralen vpliv na flokulacijo (Suthko in sod., 1993).

2.4.8 Ohladitveni šok

Po končani fermentaciji morajo pivovarji vzdrževati kvasne celice v enakem fiziološkem stanju kot ob odstranitvi iz mladega piva (Gibson in sod., 2007), da preprečijo kontaminacijo in zmanjšajo fiziološke spremembe (Boulton in Quain, 2001). Temperatura med

shranjevanjem se giblje v območju med 2 in 11 °C, pred tem pa kvasovke ohladijo na 4 °C, kar lahko vodi v ohladitveni šok (Gibson in sod., 2007).

Zniževanje temperature vodi v bolj urejeno strukturo celične membrane in zmanjšanje fluidnosti, zaradi zmanjšane vsebnosti nenasičenih maščobnih kislin, cis dvojnih vezi v lipidih, daljšanja verig in manjšega razvejanja. To vpliva na funkcije proteinov vezanih na membrano, vključno z vnosom in iznosom metabolitov ter proteinov preko plazemske membrane (Gibson in sod., 2007).

2.5 PREUČEVANJE STRESNEGA ODGOVORA NA RAVNI PROTEOMA

Med fermentacijo so kvasovke izpostavljene okolju, ki se tekom fermentacije neprestano spreminja. Na splošno vsak okoljski dejavnik, ki ima lahko negativen vpliv na celično rast, smatramo kot stres (Kobi in sod., 2004). Poleg okoljskih dejavnikov pa lahko tudi ponovno nacepljanje iste kulture vrsto fermentacij vpliva na uspešnost procesa fermentacije (Gibson in sod., 2007; Powell in sod., 2003).

Višjo raven razumevanja, kako kvasovke občutijo spreminjačoče se okolje in se nanj odzivajo med fermentacijo, lahko pridobimo z raziskovanjem transkriptoma, proteoma in/ali metaboloma (Olesen in sod., 2002). Med njimi ima proteomski pristop pomembno prednost, ki jo s preučevanjem genoma kot tudi transkriptoma ne moremo zaznati. Proteomika namreč preučuje proteine, ki so nosilci funkcij vsake žive celice (Lubec in sod., 2003). Kobi in sod. (2004) so s preučevanjem proteoma spremljali dinamiko proteinov med fermentacijo.

Stres močno vpliva na izražanje proteinov in njihove modifikacije. Celice se na izpostavljenost stresu odzovejo z vrsto mehanizmov, med drugim s preklopom metabolnih poti, nadomeščanjem poškodovanih proteinov s sintezo novih in aktivno razgradnjo le-teh (Rabilloud in sod., 2005). Za vse organizme, ki so izpostavljeni stresnim pogojem v okolju, je značilen skupen molekularni odgovor, ki je okarakteriziran z izrazito spremembo v izražanju genov, kar ima za posledico povečano sintezo družine polipeptidov, ki jih imenujemo proteini toplotnega šoka ali stresni proteini (Vanmuylde in sod., 1998). Boljše poznavanje proizvodnjih sevov in njihovih molekularnih značilnosti v industrijskem merilu, pa je zaželjeno predvsem za optimizacijo proizvodnih procesov (Caesar in sod., 2007).

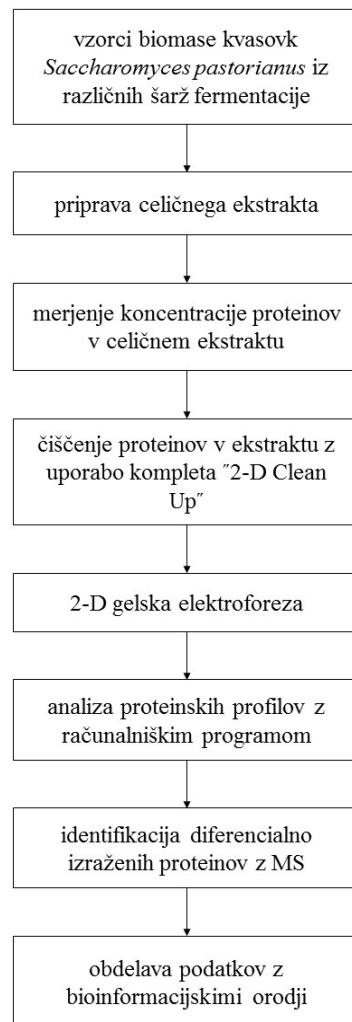
Raziskovanje proteoma pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* pa je zanimivo še z enega vidika. Slika proteoma nam prikaže neposreden odsev izražanja genoma seva iz katerega so proteini pridobljeni. Joubert in sod. (2000) so pokazali, da je proteom industrijske kvasovke lager kompleksen in ga je mogoče razložiti kot prekrivanje vsaj dveh proteinskih setov, ki izvirata iz genomov dveh različnih vrst rodu *Saccharomyces*. To je posledica hibridne narave seva, ki se odraža v različnem proteinskem vzorcu.

Analiza proteoma običajno obsega dva koraka: ločevanje proteinov in njihovo identifikacijo, ki vključuje tudi opredelitev posttranslacijskih modifikacij. Pri analizi lahko izbiramo med dvema glavnima pristopoma: a) dvo-dimenzionalno (2D) gelsko elektroforezo za ločevanje proteinov, ki ji sledi ionizacija v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov z masno spektrometrijo (MALDI-TOF-MS) za njihovo identifikacijo, in b) eno- ali dvo-dimenzionalno tekočinsko kromatografijo s katero ločimo proteine in peptide, ki jo uporabimo v povezavi z masno spektrometrijo z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ESI-MS) ali tandemsko masno spektrometrijo (MS/MS) za identifikacijo le-teh. Pogosto pa se za ločevanje in identifikacijo uporablja kombinacija metod (Gabris in sod., 2005).

Dvo-dimenzionalna elektroforeza se je pokazala kot potencialni metodološki pristop pri raziskovanju proteoma pivske kvasovke (Joubert in sod., 2000; Kobi in sod., 2004). Proteinski profil celičnega sistema je dinamičen in se vseskozi spreminja zaradi številnih znotraj- in zunajceličnih dejavnikov (Jamnik in Raspot, 2008). Za popoln opis delovanja celice je torej v vsakem trenutku potrebno poznati vse proteine, encimske aktivnosti, njihovo lokalizacijo in interakcije (Križaj, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 4: Shematski prikaz poteka dela

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizem

Za izvedbo poskusa smo uporabili pivsko kvasovko vrste *Saccharomyces pastorianus*. Iz Pivovarne Laško smo pridobili vzorce kvasne biomase, odvzete v različnih zaporednih šaržah fermentacije (A-O). Do obdelave so bili vzorci shranjeni pri temperaturi -80 °C.

Preglednica 1: Vzorci kvasne biomase za analizo proteinov

Vzorec	Zaporedna šarža
Generacija A	1.
Generacija D	8.
Generacija L	12.
Generacija N	14.
Generacija O	15.

3.2.2 Raztopine in reagenti

3.2.2.1 Ekstrakcija proteinov iz celic kvasovk

Ekstrakcijski pufer (PE)

Preglednica 2: Sestava ekstrakcijskega pufra

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	1 g	4 % (w/v)
pufer IPG (GE Healthcare)	500 µL	2 % (v/v)
DTT (Sigma)*	0,25 g	1 % (w/v)
inhibitor proteaz (Complete mini, Rosche Diagnostics)	1 tabletka/10 mL pufra	
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

* dodamo tik pred uporabo

PE smo alikvotirali po 2 mL in ga shranili pri -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi. V novo centrifugirko (Eppendorf) smo zatehtali 0,001 g ditiotreitol (DTT) (Sigma) in vanjo prenesli 1 mL odtajanega pufra tako, da je bila končna koncentracija DTT 65 mM. Ko se je DTT raztopil, smo dodali še pol tabletke inhibitorja proteaz (IP) (Complete mini, Rosche Diagnostics).

3.2.2.2 Merjenje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

- Bradfordov reagent (Bio-Rad)

Bradfordov reagent smo pripravili tako, da smo originalni koncentrat (Bio-Rad Protein Assay) 5x redčili z ddH₂O.

- Goveji serumski albumin (BSA)

3.2.2.3 Čiščenje proteinov v ekstraktu – komplet: "2-D Clean Up" kit (GE Healthcare)

Sestavine kompleta so sledeče:

- precipitacijska raztopina
- ko-precipitacijska raztopina
- pufer za izpiranje
- aditiv

3.2.2.4 Ločevanje proteinov v 1. dimenziji

Raztopina za rehidracijo trakov (RP)

Preglednica 3: Sestava osnovne raztopine za rehidracijo

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
urea (Sigma)	10,5 g	7 M
tiourea (Sigma)	3,8 g	2 M
CHAPS (GE Healthcare)	0,5 g	2 % (w/v)
pufer IPG (GE Healthcare)	500 µL	2 % (v/v)
BFM (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 25 mL		

Osnovno raztopino smo alikvotirali po 2 mL in jo zamrznili pri -20 °C, kjer jo lahko hranimo do 6 mesecev. Pred uporabo smo RP odtajali na sobni temperaturi. V novo mikrocentrifugirko smo zatehtali 0,003 g DTT (Sigma) in vanjo prenesli 1 mL odtajanega RP, da je bila končna konc. DTT 18 mM.

- Mineralno olje (Sigma)
- Trakovi z imobiliziranim pH gradientom (trakovi IPG) 4-7

Uporabili smo trakove z immobiliziranim pH gradientom dolžine 13 cm, ki smo jih hranili pri -20 °C.

3.2.2.5 Ločevanje proteinov v 2. dimenziji

Raztopine za pripravo ločilnega gela

- 1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8
 - Tris-baza (Merck) 36,3 g
 - dodamo 150 mL ddH₂O
 - uravnamo pH na 8,8 s konc. HCl
 - dodamo ddH₂O do 200 mL

Raztopino smo shranili v temi pri T = 4 °C, kjer jo lahko hranimo 3 mesece.

- 10 % (w/v) raztopina SDS
 - SDS (Sigma) 10,0 g
 - dodamo ddH₂O do 100 mL

Raztopino smo hranili na sobni temperaturi, kjer jo lahko hranimo 6 mesecev.

- Raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 % / 0,8 %) (Sigma)
- 10 % (w/v) raztopina APS
 - APS (Sigma) 0,1 g
 - dodamo ddH₂O do 100 mL

Raztopino smo pripravili svežo in jo svežo alikvotirali ter hranili pri T = -20 °C.

- TEMED (Sigma)

Ločilni gel

Preglednica 4: Sestava ločilnega gela z debelino 1 mm z 12 % (w/v) koncentracijo akrilamida

Sestavina	Količina za 2 gela	Končna koncentracija
raztopina akrilamid/bisakrilamid (30 %/0,8 %)	15,7 mL	12 % (w/v)/ 0,3 % (w/v)
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8	9,8 mL	0,6 M
10 % (w/v) raztopina SDS	0,4 mL	4 % (w/v)
ddH ₂ O	13,0 mL	4 % (w/v)
10 % (w/v) raztopina APS*	195 µL	
TEMED*	13 µL	

* raztopini APS in TEMED smo dodali k raztopini akrilamid/bisakrilamida, Tris-HCl, SDS in ddH₂O, ki smo jo predhodno razplinili v ultrazvočni kopeli (10 min)

Osnovni pufer za uravnovešenje

Preglednica 5: Sestava osnovnega pufra za uravnovešenje

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
1,5 M raztopina Tris-HCl, pH = 8,8	5 mL	75 mM
urea (Sigma)	36 g	6 M
glicerol (Sigma)	30 mL	30 % (v/v)
SDS (Sigma)	2 g	2 % (w/v)
bromfenol modro (BFM) (Sigma)	1 kristalček	0,002 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 100 mL		

Osnovni pufer za uravnovešenje smo alikvotirali in zamrznili pri -20 °C. Pred uporabo smo ga odtajali na sobni temperaturi.

- Pufer za uravnovešenje I (65 mM DTT)

Pufer za uravnovešenje I smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,1 g DTT v falkonko in mu dodali 10 mL osnovnega pufra za uravnovešenje, zmešali, da se je DTT raztopil in raztopino razdelili v 2 epruveti po 5 mL (v primeru uporabe dveh trakov IPG).

- Pufer za uravnovešenje II (260 mM JAA)

Pufer za uravnovešenje II smo pripravili tako, da smo zatehtali 0,48 g jodacetamida (JAA) v falkonko, mu dodali 10 mL osnovnega pufra za uravnovešenje, zmešali, da se je JAA raztopil in raztopino razdelili v 2 epruveti po 5 mL (v primeru uporabe dveh trakov IPG).

Pufra za uravnoteženje I in II smo pripravili sveža.

Agarozna raztopina

Preglednica 6: Sestava agarozne raztopine

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
agaroza (Sigma)	0,5 g	0,5 % (w/v)
1x SDS elektroforezni pufer	100 mL	
bromfenol modro (BFM) (Sigma)	1 kristalček	

Raztopino smo segreli v mikrovalovni pečici, da se je agarosa lažje raztopila in ji dodali 1 kristalček barvila bromfenol modro (BFM). Raztopino smo alikvotirali v centrifugirke in jo hranili 1 mesec na sobni temperaturi.

1x SDS elektroforezni pufer

Preglednica 7: Sestava 1x SDS elektroforeznega pufra

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
Tris-baza (Sigma)	3,0 g	25 mM
glicin (Merck)	14,4 g	192 mM
SDS (Sigma)	1,0 g	0,1 % (w/v)
dodamo ddH ₂ O do 1000 mL		

3.2.2.6 Barvanje 2-D gelov z barvilm SYPRO RUBY

Fiksacijska raztopina

Preglednica 8: Sestava fiksacijske raztopine

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
100 % (v/v) metanol (Merck)	500 mL	50 % (v/v)
100 % (v/v) ocetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
ddH ₂ O do 1000 mL		

- Barvilo SYPRO RUBY (Invitrogen)

Raztopina za razbarvanje

Preglednica 9: Sestava raztopine za razbarvanje

Sestavina	Količina	Končna koncentracija
100 % (v/v) metanol (Merck)	100 mL	10 % (v/v)
100 % (v/v) ocetna kislina (Merck)	70 mL	7 % (v/v)
ddH ₂ O do 1000 mL		

3.2.3 Aparature in naprave

Pri delu smo poleg standardne laboratorijske opreme uporabljali tudi sledeče aparature in naprave:

Priprava reagentov in raztopin:

- pH-meter Seven multi (Mettler Toledo)
- parni sterilizator – avtoklav (Sutjeska)
- magnetno mešalo MM-540 (Tehnica)
- tehnica exellence (Sartorius)
- tehnica PS 1200/C/2 (Radwag)

Priprava biomase:

- centrifuga miniSpin (Eppendorf)

Ekstrakcija proteinov:

- cirkonij-kremenčeve kroglice (0,5 mm) (BioSpec Products)
- homogenizator Bullet Blender Storm 24 (Next Advance)
- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)

Merjenje koncentracije proteinov:

- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- prozorne 96-mestne mikrtotitrskie plošče (Nunc)

Čiščenje proteinov v ekstraktu:

- centrifuga z možnostjo hlajenja (Sigma)
- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- centrifuga miniSpin (Eppendorf)

1. dimezija:

- vrtinčnik TTS2 (Ika)
- centrifuga miniSpin (Eppendorf)
- podstavek z režami in pokrovom za rehidracijo trakov (GE Healthcare)
- elektroforetska enota Multiphor II (GE Healthcare)
- steklen podstavek z elektrodnimi priključki (Pharmacia Biotech)
- plastična plošča z vdolbinami
- elektrodni trakovi (GE Healthcare)
- elektrodi (anoda, katoda)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

2. dimenzija:

- stresalna plošča (Biometra)
- steklene plošče
- distančniki (1 mm)
- primež z vijaki
- nosilci
- stički
- ultrazvočna kopel (Sonis-Pio)
- mikrovalovna pečica (Sanyo)
- SDS-PAGE posoda (zgornja in spodnja) (GE Healthcare)
- termostatski cirkulator (GE Healthcare)
- usmernik EPS 3501 XL (GE Healthcare)

Barvanje gelov:

- stresalna plošča (Biometra)
- plastične banjice 19,5 x 20,8 cm (Rotho)

Analiza slike in statistična analiza rezultatov:

- program za analizo gelov 2-D Dymension (Syngene)
- program za slikanje in dokumentacijo gelov GeneSnap (Syngene)
- sistem za dokumentacijo gelov CAM-GX-CHEMI HR – Gbox kamera (Syngene)

Izrezovanje 2-D elektroforetskih lis

- UV luč

Hladilniki in zamrzovalniki za shranjevanje raztopin, reagentov in vzorcev:

- zamrzovalnik (-20 °C) (LTH)
- hladilnik (4 °C) (LTH)
- zamrzovalnik Ultra Freeze (-80 °C) (Heto)

3.3 METODE

3.3.1 Vzorci kvasne biomase

Vzorce pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* smo pridobili v sodelovanju s Pivovarno Laško. Vzorci biomase so bili odvzeti tekom različnih zaporednih šarž fermentacij, in sicer vedno po končanem procesu fermentacije (Preglednica 1) ter shranjeni pri -80 °C do nadaljnje obdelave.

3.3.1.1 Priprava biomase

Biomaso smo odtajali in jo razdelili na dva enaka dela v novi mikrocentrifugirki. Vzorce smo centrifugirali pri 14000 vrt./min 5 min, odstranili supernatant in biomaso shranili nazaj na -80 °C. Polovica biomase nam je služila kot rezerva, drugo polovico pa smo uporabili za poskus in ekstrakcijo proteinov.

3.3.2 Priprava celičnega ekstrakta

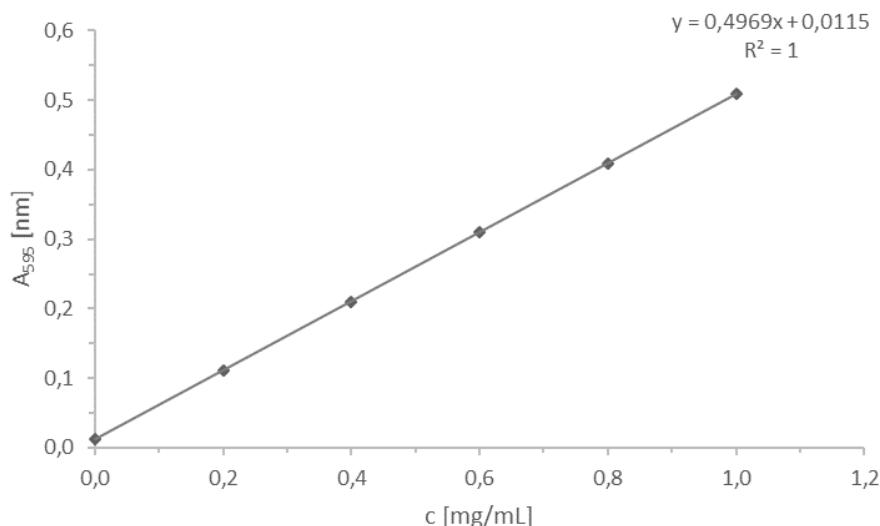
3.3.2.1 Razbijanje celic kvasovk s cirkonij-kremenčevimi kroglicami

Vzorce biomase smo odtajali na ledu ter jim dodali 300 µL pufra za ekstrakcijo (Preglednica 2) in ½ žličke (~0,5 g) cirkonij-kremenčevih kroglic. Celice smo razbili 2x po 3 min v homogenizatorju z vmesnim 5-minutnim intervalom na ledu. Homogenat smo centrifugirali 20 min na 20 000 g pri 4 °C. Supernatant (= celični ekstrakt) smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko, pelet pa zavrgli. Supernatant smo alikvotirali v nove mikrocentrifugirke po 50 µL. En alikvot smo uporabili za nadaljnje delo in čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu, ostale pa smo shranili pri -80 °C.

3.3.3 Merjenje koncentracije proteinov v celičnem ekstraktu

Koncentracijo proteinov v ekstraktu smo določili po metodi Bradford (Bradford, 1976) na podlagi predhodno določene umeritvene krivulje. Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili BSA v različnih koncentracijah: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 in 1 g/L. 4 µL vsake raztopine z

različno koncentracijo BSA smo odpipetirali v jamico prozorne 96-mestne mikrotitrsko plošče in jim dodali 196 µL 1x Bradfordovega reagenta ter premešali. Po 5 minutah smo izmerili absorbanco na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan) pri valovni dolžini 595 nm.



Slika 5: Umeritvena krivulja za merjenje koncentracije proteinov po Bradfordu

V primeru vzorcev smo v jamice prozorne mikrotitrsko plošče odpipetirali 4 µL ustreznega razredčenega ekstrakta. Vzorcem smo dodali 196 µL 1x Bradfordovega reagenta in premešali. Spleti vzorec je predstavljal pufer, v katerem so bili pripravljeni celični ekstrakti in je bil prav tako ustrezen redčen. Po 5 minutah smo izmerili absorbanco na čitalcu mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan) pri valovni dolžini 595 nm. Rezultatom vzorcev smo odšteli spleti vzorec in iz enačbe umeritvene krivulje izračunali koncentracijo proteinov.

3.3.4 Čiščenje proteinov v celičnem ekstraktu s kitom "2-D Clean Up"

Vzorec ekstrakta smo prenesli v novo mikrocentrifugirko ter mu dodali 3-kratni volumen precipitacijske raztopine (glede na volumen vzorca). V našem primeru smo imeli 100 µL vzorca, zato smo dodali 300 µL precipitacijske raztopine. Mešanico smo zmešali na vrtinčniku in inkubirali 15 min na ledu. Nato smo mešanici vzorca in precipitacijske raztopine dodali 3-kratni volumen ko-precipitacijske raztopine (glede na volumen vzorca – v našem primeru 300 µL) in na kratko premešali na vrtinčniku. Vzorec smo centrifugirali pri 12 000 g 5 min in T = 4 °C. S pipetiranjem smo odstranili supernatant, sedimentu pa dodali 80 µL ko-precipitacijske raztopine (takšen volumen, da prekrije sediment) in inkubirali na ledu 5 min. Sledilo je centrifugiranje pri 12 000 g 5 min in T = 4 °C, po katerem smo ponovno previdno

odstranili supernatant. Sedimentu smo dodali 50 µL ddH₂O oziroma toliko, da smo prekrili sediment ter mešali na vrtinčniku toliko časa, da se je sediment resuspendiral. Mešanici smo dodali 1 mL pufra za izpiranje (hlajen pri T = -20 °C vsaj 1 h) in 5 µL aditiva ter zmešali na vrtinčniku, da se je sediment resuspendiral. Sledila je inkubacija pri T = -20 °C 30 min, z vmesnim 20-30 sek mešanjem na vrtinčniku vsakih 10 min. Po inkubiranju smo vzorce centrifugirali pri 12 000 g 5 min in T = 4 °C. Odstranili smo supernatant in sediment posušili na zraku, vendar ne več kot 5 min (viden bel sediment) in ga shranili pri -80 °C.

3.3.5 Ločevanje proteinov z dvo-dimenzionalno gelsko elektroforezo

Z 2-DE ločujemo proteine glede na izoelektrično točko (1. dimenzija) in glede na njihovo molekulsko maso (2. dimenzija). Ker sta parametra med seboj neodvisna ter omogočata visoko ločljivost in občutljivost sistema, lahko s to metodo zaznamo zelo veliko število proteinov, ekstrahiranih iz kompleksnih bioloških virov (O'Farrell, 1975). Glede na velikost gela in uporabljen pH gradient, lahko hkrati ločimo več kot 5000 proteinov in zaznamo < 2 ng proteinov na elektroforetsko liso (Görg in sod., 2007a). S to tehniko lahko kvalitativno primerjamo izražanje proteinov med dvema različnima skupinama (Joubert in sod., 2000) kot tudi kvalitativno ovrednotimo post-translacijske modifikacije (Larsen in sod., 2001) ali pa primerjamo izražanje proteinov med zaporednimi šaržami fermentacij znotraj iste skupine, kot smo to primerjali v našem primeru.

3.3.5.1 Ločevanje proteinov v 1. dimenziji

V prvi dimenziji smo proteine ločevali glede na njihovo izoelektrično točko (pI), to je pH pri katerem imajo proteini celokupen naboj enak nič (Madigan in sod., 2009). Proteini pod vplivom električne napetosti potujejo vzdolž pH gradiента, pozitivno nabiti proti negativno nabiti elektrodi (katodi) in negativno nabiti proti pozitivno nabiti (anodi), dokler navzven ne dosežejo elektroneutralnosti (Bavec in sod., 2008; Anderluh in sod., 2009). Prva dimenzija zajema več korakov, in sicer rehidracijo trakov in izoelektrično fokusiranje.

3.3.5.1.1 Priprava vzorcev za nanos na trakove IPG

Proteinski sediment, ki smo ga pridobili po čiščenju ekstrakta z uporabo kompleta (točka 3.3.4) smo zmešali z RP (Preglednica 3) tako, da smo dosegli koncentracijo proteinov 0,4 µg/µL. Vsebnost proteinov v 250 µL RP je bila tako 100 µg. Za rehidracijo proteinov smo uporabili RP s pH v območju 4-7. Vzorce smo 1 min mešali na vrtinčniku in 15 min inkubirali na sobni temperaturi, nato pa centrifugirali 5 min pri 14000 vrt./min (centrifuga miniSpin, Eppendorf).

RP vsebuje ureo, tioureo, CHAPS, DTT in pufer IPG. Urea in tiourea sta kaotropa in prekineta vodikove vezi in hidrofobne interakcije v proteinu, zmanjšata agregacijo proteinov in povečata njihovo topnost. CHAPS je detergent in prekine hidrofobne interakcije ter poveča topnost proteinov. DTT je reducent, ki prekine disulfidne vezi in jih vzdržuje v reduciranim stanju. Pufer IPG vsebuje nosilne amfolite, ki izboljšajo topnost proteinov in preprečujejo njihovo agregacijo preko ionskih interakcij ter zagotavljajo bolj enakomerno prevodnost (Görg in sod., 2007b).

3.3.5.1.2 Rehidracija trakov

Uporabili smo komercialno pripravljene trakove z imobiliziranim pH gradientom (trakove IPG) s pH območjem 4-7, saj se v tem pH območju proteini kvasovk najbolje ločijo. Na sredino reže na podstavku za rehidracijo smo nanesli 250 µL raztopine za rehidracijo trakov (RP) z raztopljenimi proteini. Z traku IPG smo odstranili zaščitno plastično folijo, ki prekriva gel in ga previdno položili v režo z gelom navzdol preko RP z vzorci. Režo smo nato prekrili s 3 mL mineralnega olja, ki preprečuje kristalizacijo uree in evaporacijo vode iz RP. Podstavek smo prekrili s pokrovom in aluminijasto folijo ter pustili čez noč (~13 h), da so se trakovi rehidrirali.

3.3.5.1.3 Izoelektrično fokusiranje - IEF

Na ploščo, ki zagotavlja konstantno temperaturo 20 °C med potekom IEF, smo nanesli 4x po 1 mL mineralnega olja v ravnih črtah in brez tvorbe mehurčkov. Na ploščo z oljem smo položili steklen podstavek z elektrodnimi priključki, vanj vlili 10 mL mineralnega olja in preko olja položili plastično ploščo z vdolbinami. Po končani rehidraciji smo trakove nekajkrat pomočili v ddH₂O, da smo s traku sprali kristalčke uree, na hitro sprali z ddH₂O in jih osušili na filter papirju. Trakove smo z gelom navzgor prenesli v vdolbine na plošči tako, da je bil plus konec traku, kjer je pH nižji, na anodni strani. Nato smo odrezali dva enako dolga elektrodna trakova, ju sprali z ddH₂O, nekoliko osušili na papirnatih brisačkih in položili pravokotno preko koncev trakov IPG, enega na zgornji (anodni) konec in drugega na spodnji (katodni) konec traku tako, da sta bila v stiku z gelom. Čez elektrodna trakova smo po sredini namestili elektrodi in ju vpeli v steklen podstavek. Trakove smo prelili s 150 mL mineralnega olja in pokrili s pokrovom.

IEF ploščo smo povezali z usmernikom, na katerem smo nastavili 4 faze:

1. faza: 0-300 V, 1 min
2. faza: 300 V, 1 h
3. faza: 300-3500 V, 1 h 30 min
4. faza: 3500 V, 5 h

Tok teče od katode (-) proti anodi (+). Prvi dve fazi sta namenjeni temu, da iz gelov izstopijo nizkomolekularni ioni.

IEF je potekalo pri 20 °C (termostatski cirkulator), saj s hlajenjem vzdržujemo pH gradient. Mineralno olje pa služi kot topotni prevodnik.

Po končanem IEF smo trakove shranili pri -80 °C do izvedbe 2. dimenzije.

3.3.5.2 Ločevanje proteinov v 2. dimenziji

V drugi dimenziji smo proteine ločevali glede na njihovo molekulsko maso (MW). Uporabili smo elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS), ki denaturira proteine in jih obda z negativnim nabojem (Bavec in sod., 2008; Anderluh in sod., 2009). Vsi proteini so tako enako nabiti, zato ločevanje poteka izključno na podlagi njihove mase (Westermeier, 2001). Druga dimenzija obsega več korakov: vlivanje gelov, uravnoveženje trakov, prenos trakov na ločilni gel in SDS-PAGE.

3.3.5.2.1 Vlivanje gelov

Pred vlivanjem gelov smo najprej sestavili kalup iz steklenih plošč tako, da smo med stekleni plošči na desno in levo stran dali distančnika (debeline 1 mm) in vse skupaj vpeli v primeža z vijaki. Kalup smo nato s stiščki vpeli v nosilec. Med stekleni plošči smo s stekleno pipeto vlili 19 mL ločilnega gela (Preglednica 4) z ustrezno konc. akrilamida (12 % (w/v) akrilamid, ki je primeren za ločevanje proteinov velikosti 10-200 kDa). Na zgornjo površino gela smo z drugo stekleno pipeto nanesli tanko plast ddH₂O, ki gelu preprečuje stik s kisikom, kar omogoča enakomerno polimerizacijo. Ko je gel polimeriziral (po 2 h oz. naslednji dan), smo odlili vodo in površino gela dobro osušili.

3.3.5.2.2 Uravnoveženje trakov IPG

Trakove smo vzeli iz zamrzovalnika in jih sprali v 5 epruvetah z 1x SDS elektroforeznim pufrjem (Preglednica 5). Po spiranju smo trakove prenesli v epruvete s 5 mL pufra za

uravnoteženje I in jih dali na stresalnik za 15 min. Iz pufra za uravnoteženje I smo jih prenesli v epruvete s 5 mL pufra za uravnoteženje II in jih dali na stresalnik, da so se stresali še 15 min. Po uravnoteženju smo jih prenesli na filter papir in jih osušili z gelom obrnjenim navzgor.

3.3.5.2.3 Prenos trakov IPG na ločilni gel

Na površino ločilnega gela smo nalili agarozno raztopino (Preglednica 6), ki smo jo predhodno segreli na 100 °C, da se je le-ta raztopila. Takoj za tem smo skozi agarozno raztopino previdno, brez tvorbe mehurčkov, spustili trak IPG, ki se je usedel na površino gela. Nato smo počakali, da se je agarozna raztopina strdila (~15 min).

3.3.5.2.4 SDS-PAGE

Ko se je agarozna raztopina strdila, smo kalup s stički vpeli v zgornjo posodo za SDS-PAGE in odstranili nosilec. Vse skupaj smo nato prenesli v spodnjo posodo za SDS-PAGE in obe posodi napolnili z 1x SDS elektroforeznim pufrom (Preglednica 7), spodnjo posodo s 4 L, zgornjo pa s 700 mL 1x SDS elektroforeznega pufra.

Posodo za SDS-PAGE smo povezali z usmernikom, na katerem smo nastavili 2 fazi:

1. faza: 20 mA/gel, 15 min, kar omogoča skoncentriranje proteinov in vstop le-teh v gel
2. faza: 40 mA/gel, dokler barvilo (BFM) ne doseže spodnjega roba gela (~1 h 35 min)

SDS-PAGE je potekala pri 20 °C (termostatski cirkulator).

Po končani elektroforezi smo kalup previdno razstavili, gel vzeli iz stekel, odstranili trak IPG in gel ustrezno označili.

3.3.6 Barvanje 2-D gelov z barvilm SYPRO RUBY

Gele smo barvali z barvilm SYPRO RUBY (Preglednica 10). Prednosti barvila SYPRO RUBY pred ostalimi barvili so predvsem v tem, da je visoko občutljivo in zazna že nizke konc. proteina (od 0,25 do 1 ng), ima široko linearne območje, kar omogoča kvantifikacijo, saj je masa proteina linearno odvisna od intenzitete barvila v območju treh velikostnih razredov (Görg in sod., 2007a; Berggren in sod., 2000; Berggren in sod., 2002; SYPRO Ruby, 2007), tretja prednost pa je nespecifična vezava barvila na proteine (SYPRO Ruby, 2007).

Preglednica 10: Postopek barvanja gelov

Korak	Raztopina	Čas
fiksacija	200 mL fiksacijske raztopine	2 x 30 min
barvanje	250 mL barvila SYPRO RUBY	preko noči
razbarvanje	200 mL raztopine za razbarvanje	2 x 30 min
izpiranje	250 mL ddH ₂ O	3 x 5 min

* količine raztopin zadoščajo za barvanje 2 gelov v isti banjici

Gele smo med posameznimi koraki barvanja stresali na stresalni plošči, da so bili ves čas obliti z ustrezno raztopino.

S fiksacijo smo preprečili difuzijo proteinov in iz gela sprali odvečne ione in SDS. Vse nadaljnje postopke smo izvajali v temi, saj je barvilo SYPRO RUBY občutljivo na svetlobo, zato smo banjice dodatno zaščitili z aluminijasto folijo. Po razbarvanju smo gele prenesli v novo posodo, saj smo tako zmanjšali obarvanost ozadja ter nespecifične signale.

3.3.7 Slikanje gelov in pregled rezultatov

3.3.7.1 Slikanje gelov

Gele smo slikali s sistemom za dokumentacijo gelov, in sicer z CAM-GX-CHEMI HR – Gbox kamero in s pomočjo programa GeneSnap.

Barvilo SYPRO RUBY ima ekscitacijski maksimum pri valovni dolžini 280 nm in emisijski maksimum pri valovni dolžini 610 nm (Berggren in sod., 2002).

Pri slikanju gelov smo nastavili ustrezne parametre:

- zaslonka: 1,2
- povečava: 12,5
- izostritev: 140
- čas izpostavitve: 100 ms

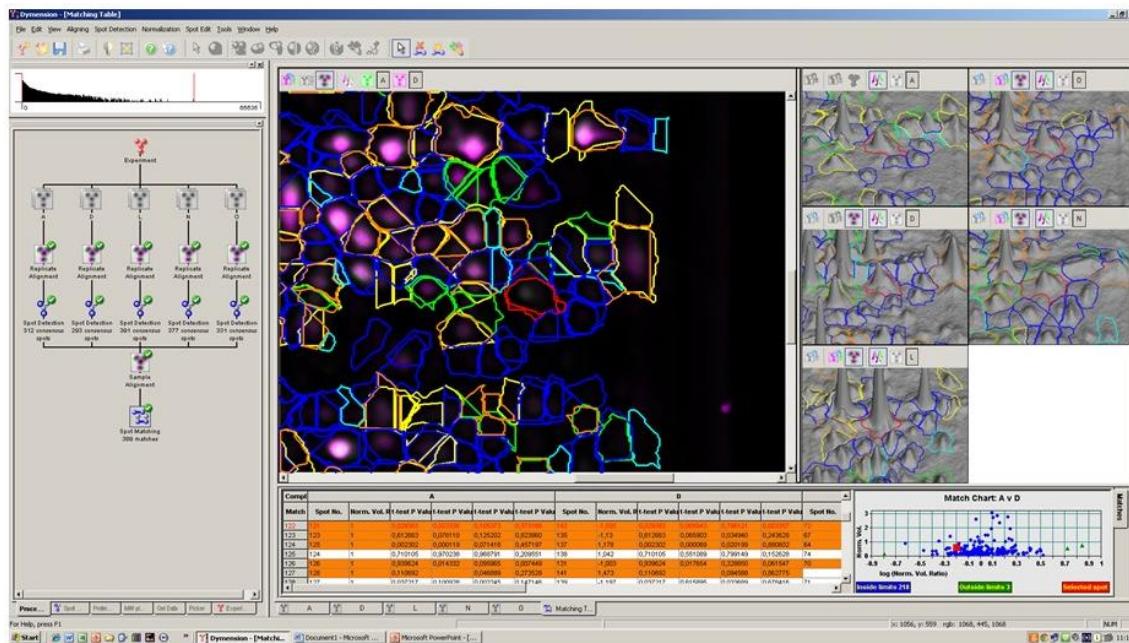
Po končanem slikanju smo gele shranili v hladilniku, do izrezovanja proteinskih lis.

3.3.7.2 Analiza slik

Slike gelov smo analizirali v programu 2-D Dymension. S tem programom lahko med seboj primerjamo več gelov. Enega izmed gelov postavimo za referenčni gel, s katerim primerjamo testirane vzorce. V našem primeru je bila kot referenčni gel vzeta prva šarža fermentacije, glede na katero smo nato primerjali vse ostale vzorce, odvzete tekom različnih zaporednih šarž.

Najprej smo na vseh slikah določili opazovano območje in odstranili moteče robove gelov ter določili položaj 2-D elektroforetskih lis na posameznem gelu. Določili smo ustrezne parametre za zaznavanje 2-D lis. Tako smo določili ravnino zaznavanja in s tem izključili šum ozadja ter tako zagotovili, da je program res označil le proteine. Določili smo tudi razmerje zaupanja da program dve lisi res zazna kot dve ločeni lisi.

Program na podlagi nastavljenih parametrov prepozna skupne 2-D lise na vseh gelih, jih prekrije in primerja med seboj. Pregledali smo 2-D lise, ki jih je program avtomatsko zaznal in obkrožil ter preverili, kako se posamezne 2-D lise na referenčnem gelu ujemajo z 2-D lisami na ostalih gelih. Pri pregledovanju smo si pomagali s tridimenzionalnim pogledom 2-D lis in hkrati preverili, ali so le-te pravilno obkrožene. Izražanje proteinov smo ocenili iz preglednice, ki podaja normalizirane vrednosti volumnov 2-D lis glede na referenčni gel. Tako smo lahko videli, ali so proteini bolj (normaliziran volumen 2-D lis se poveča) ali manj (normaliziran volumen 2-D lis se zmanjša) izraženi kot pri referenčnem gelu.



Slika 6: Primer obdelave 2-D elektroforetske lise (obkrožena z rdečo barvo) s programom 2-D Dymension

Normaliziran volumen predstavlja razmerje med volumnom ene lise proti celokupnemu volumnu vseh lis na gelu (Enačba 2).

$$V_N [\%] = \frac{V}{\sum_{i=1}^n V_i} \quad \dots (2)$$

Z normaliziranimi volumni in razmerjem med njimi se izognemo vplivu variacij v nanosu proteinov in barvanju med posameznimi geli.

Izražanje je definirano kot diferencialno, če je razmerje med V_N posamezne 2-D lise tretiranega vzorca in V_N kontrole oz. reference večje ali manjše od 2.

3.3.7.3 Statistična analiza spremembe proteoma

Za ugotavljanje statistično značilnih razlik v izražanju proteinov smo v programu 2-D Dymension naredili statistično analizo Studentov t-test. Studentov t-test je definiran kot preizkušanje domneve o razlikah med povprečjema dveh vzorcev. Pri obdelavi rezultatov smo uporabili zgornjo mejo tveganja $p < 0,05$ tako, da lahko z več kot 95 % verjetnostjo trdimo, da se povprečji obeh vzorcev statistično značilno razlikujeta (Košmelj, 2001).

3.3.8 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo

Diferencialno izražene proteine smo izrezali iz gelov in jih poslali na identifikacijo z masno spektrometrijo na Univerzo York v Veliki Britaniji. Pri izrezovanju smo si pomagali z UV lučjo, saj barvilo SYPRO RUBY dobro sveti v območju valovnih dolžin v območju UV svetlobe, zato so bile 2-D elektroforetske lise dobro vidne.

3.3.9 Obdelava podatkov z bioinformacijskimi orodji

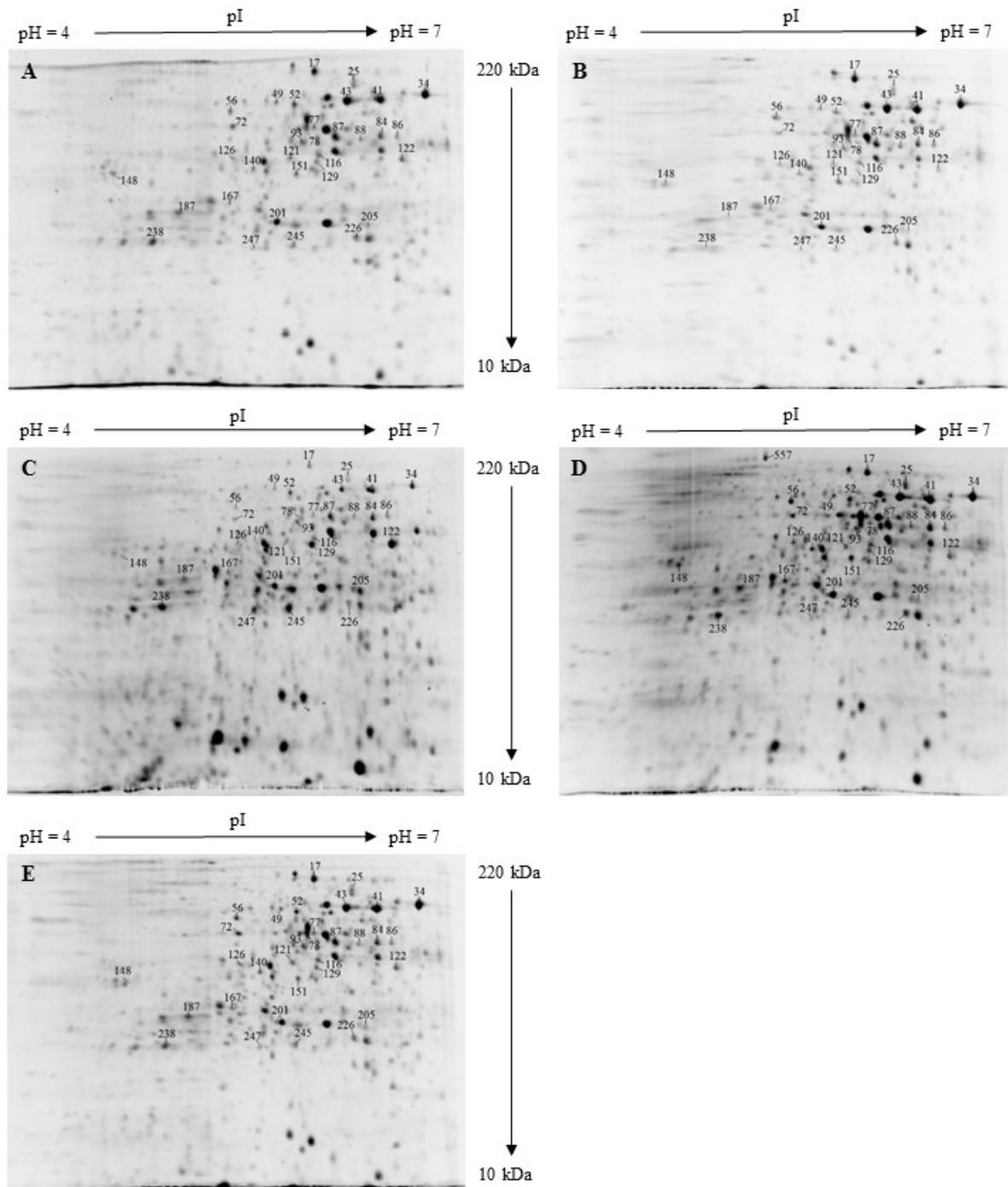
Pri obdelavi rezultatov identificiranih proteinov smo si pomagali s spletnimi bazami podatkov kot so: UniProt (The UniProt Consortium, 2015), KEGG (Kanehisa in sod., 2015) in SGD (*Saccharomyces* Genome Database) (Cherry in sod., 2012).

4 REZULTATI

V okviru magistrskega dela smo določili in identificirali diferencialno izražene proteine pivske kvasovke vrste *Saccharomyces pastorianus* tekom različnih zaporednih šarž fermentacij (1., 8., 12., 14. in 15.). Vzorce kvasne biomase, ki so bili odvzeti vedno po končanem procesu fermentacije, smo pridobili v sodelovanju s Pivovarno Laško. Iz vzorcev kvasne biomase smo ekstrahirali totalne celične proteine, ki smo jih nato očistili z uporabo kompleta: "2-D Clean Up" kit. Proteine smo ločili z 2-DE v območju MW 10-220 kDa in pI 4-7 ter gele obarvali z barvilom SYPRO Ruby. Proteinske profile vzorcev različnih zaporednih šarž fermentacij (generacije 8, 12, 14 in 15) smo primerjali glede na kontrolo (generacija 1) z uporabo računalniškega programa 2-D Dymension. Za vsak vzorec smo naredili dve ponovitvi in za analizo statističnih razlik v ravni proteinov uporabili statistično analizo Studentov t-test ($p < 0,05$) (Preglednica 11 in Priloga A).

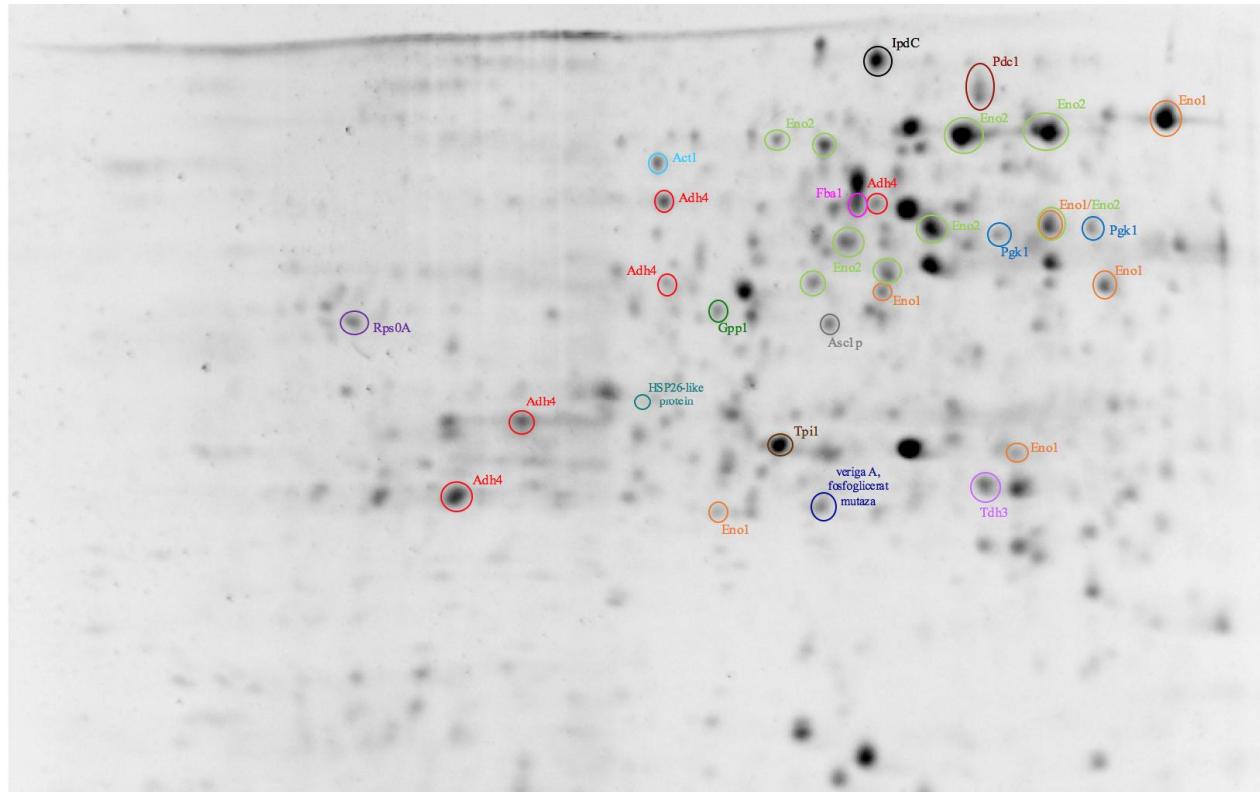
Izmed vseh diferencialno izraženih proteinov (skupno 51 proteinov, Priloga A), smo identificirali 33 proteinov, ki so prikazani v preglednici 11.

Slika 7 prikazuje pregled proteinskih profilov generacij 1, 8, 12, 14 in 15 z označenimi diferencialno izraženimi proteini. Proteinski profili vseh diferencialno izraženih proteinov po posameznih generacijah, pa so prikazani v prilogah B-F.



Slika 7: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* tekom različnih zaporednih šarž fermentacije (A – generacija 1; B – generacija 8; C - generacija 12; D – generacija 14; E – generacija 15). 2-D lise, ki so označene na slikah, nakazujejo identificirane diferencialno izražene proteine.

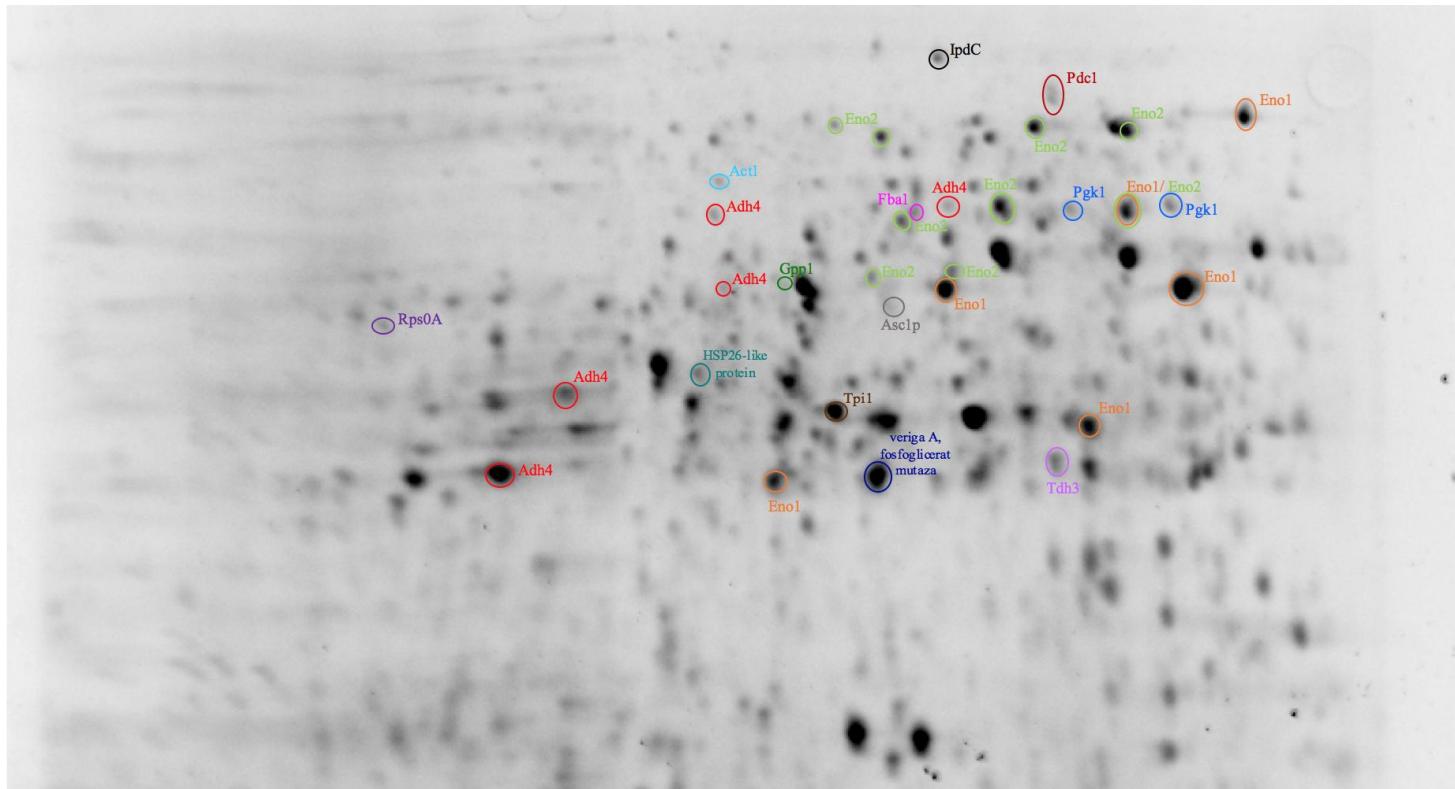
Sledeče slike (Slike 8-12) prikazujejo podoben prikaz, kjer pa je poleg 2-D lise navedena identiteta proteinov za posamezno generacijo. Vsak protein je zaradi boljše preglednosti označen s svojo barvo (isti proteini z isto barvo), saj so nekateri proteini prisotni na večih mestih.



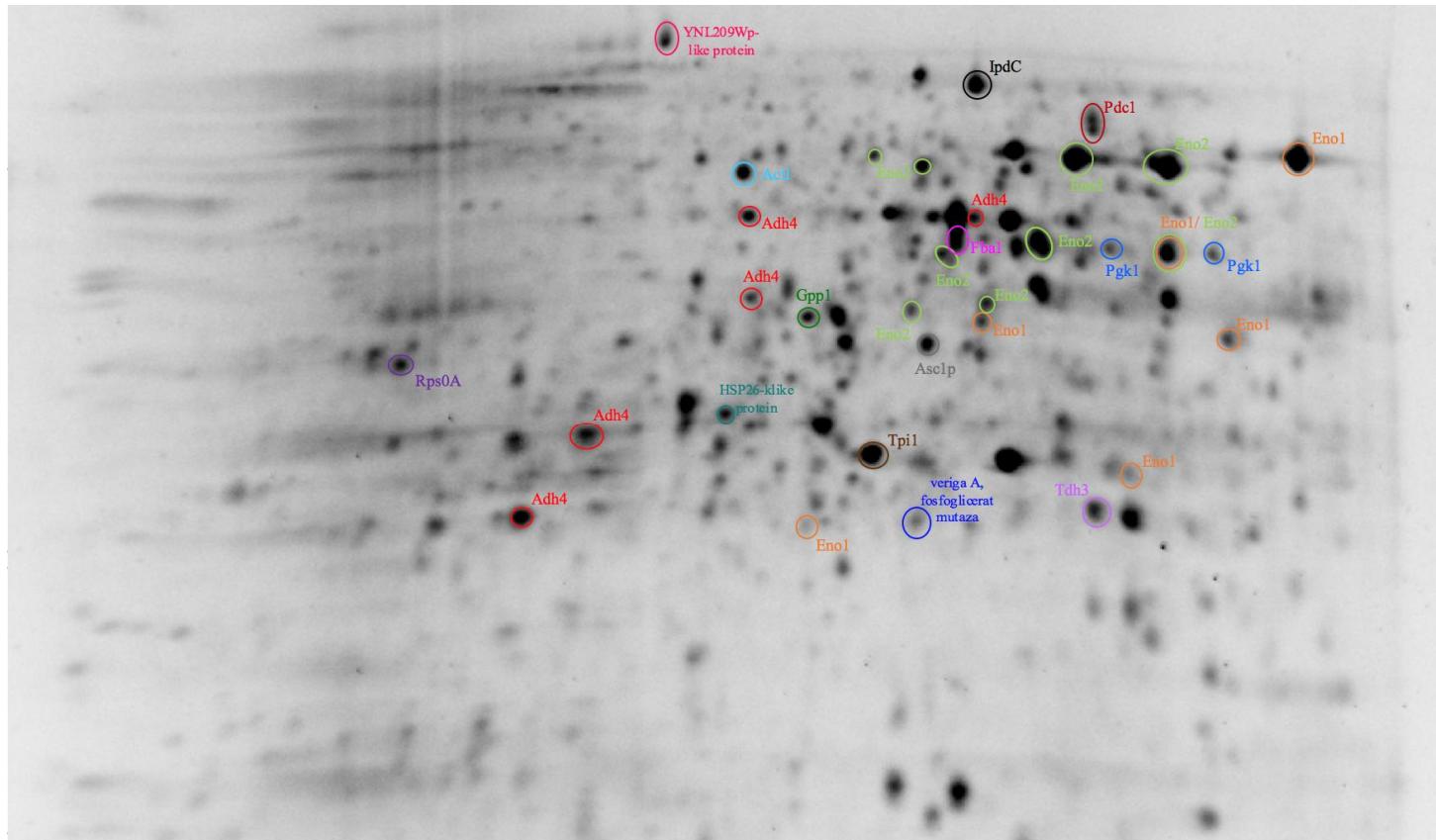
Slika 8: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 1 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali



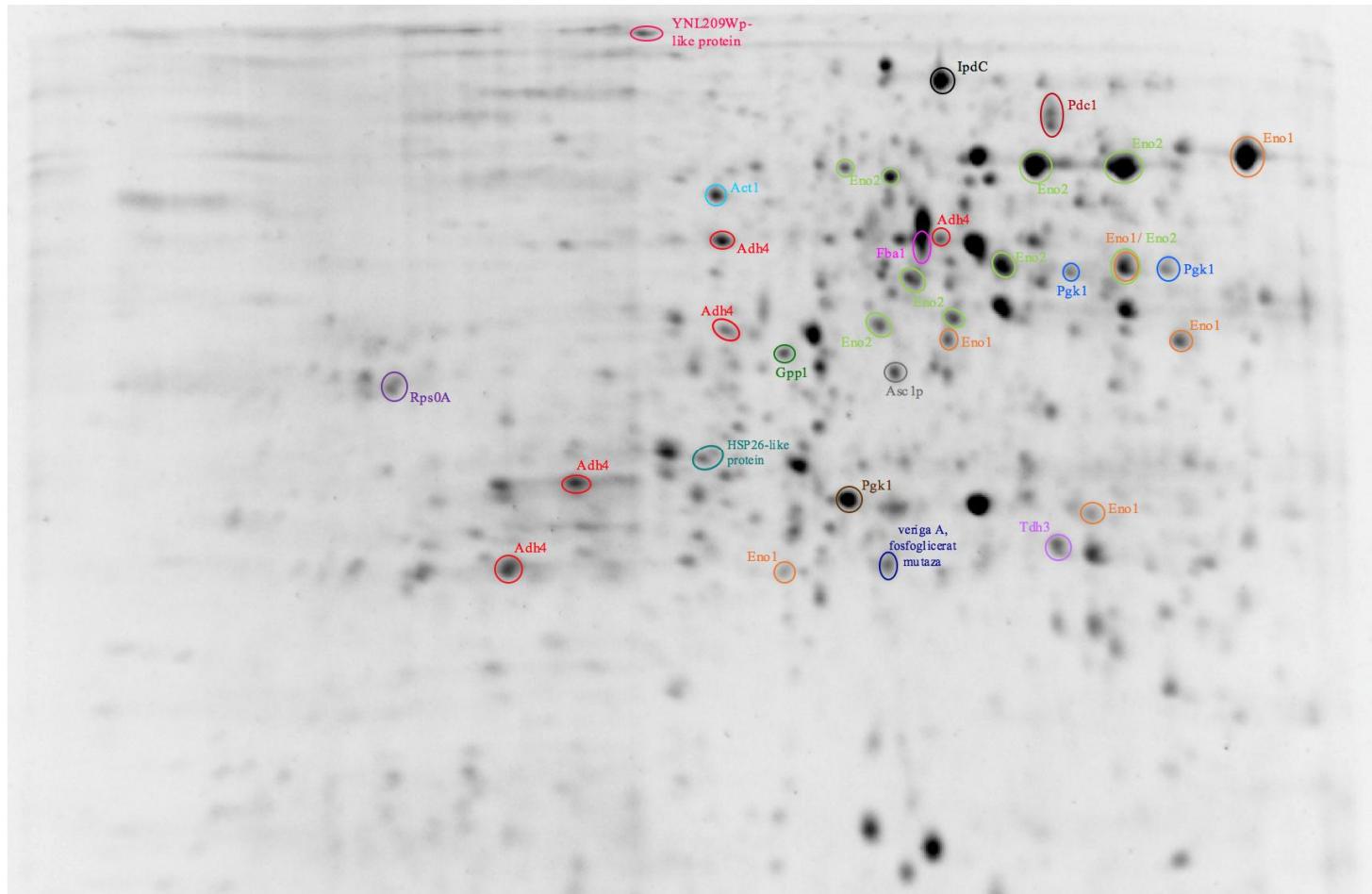
Slika 9: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 8 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali



Slika 10: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 12 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali



Slika 11: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 14 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali



Slika 12: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 15 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov, ki smo jih identificirali

Preglednica 11 prikazuje podatke, ki smo jih pridobili po identifikaciji proteinov z masno spektrometrijo (Univerza York). Prikazana je generacija, pri kateri je prišlo do značilne spremembe v ravni izražanja proteinov, glede na referenco (generacija 1). Zbrane so tudi vrednosti izračunane s programom 2-D Dymension, in sicer razmerja vrednosti normaliziranih columnov in Studentov t-test, s katerim smo preverili statistično značilnost diferencialne ravni proteina glede na referenco (generacija 1).

Identificirani proteini so homologni proteinom identificiranim pri kvasovki *S. cerevisiae* S288C. To je posledica hibridne narave kvasovke *S. pastorianus* med kvasovko *S. cerevisiae* in drugo še neznano vrsto rodu *Saccharomyces*.

Preglednica 11: Identifikacija diferencialno izraženih proteinov celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* v različnih šaržah fermentacije

Št. 2-D liste	Δ^a	Raven izražanja ^b	R ^c	p ^d	Ime proteina ^e	Pristopna št. ^f	PM ^g	SC (%) ^h	Seštevek ⁱ
17	12	-	9,747	0,014167	IpdC	P06169	5		116
25	12	-	5,856	0,020748	Pdc1	P06169	1	2	39
34	12	-	5,186	0,0118	Eno1	P00924	7	23	589
41	12	-	4,165	0,018335	Eno2	P00925	3	11	282
43	12	-	7,84	0,000114	Eno2	P00925	4	13	388
49	12	-	4,154	0,014317	Eno2	P00925	2	8	129
52	12	-	3,715	0,019019	Eno2	P00925	3	10	288
56	12	-	5,941	0,011285	Act1	P60010	1	4	109
72	12	-	7,821	0,009929	Adh4 ^j	P10127	1	4	74
77	12	-	4,262	0,02645	Adh4 ^j	P10127	1	4	37
78	12	-	7,659	0,023819	Fba1	P14540	1	6	86
84	12	-	2,606	0,034731	Eno2/Eno1	P00925/00924	3/3	10/9	265/237
86	12	-	2,47	0,035043	Pgk1	P00560	1	3	54
87	12	-	2,984	0,005016	Eno2	P00925	1	4	59
88	12	-	4,332	0,01905	Pgk1	P00560	1	3	95
93	12/14	-	3,492 / 2,8	0,027	Eno2	P00925	1	4	74
116	12	-	3,228	0,025076	Eno2	P00925	2	8	141
121	12	-	3,365	0,001978	Eno2	P00925	2	8	125
122	12	+	2,184	0,023338	Eno1	P00924	1	3	38
126	12	-	2,537	0,014332	Adh4	P10127	6		94
129	12	+	2,349	0,002172	Eno1	P00924	2	6	118
140	12	-	4,238	0,001596	Gpp1 ^j	P41277	1	5	61
148	12	-	4,563	0,00618	Rps0A	P32905	1	6	67
151	12	-	3,635	0,015323	Asclp	P38011	3		88
167	14	+	2,486	0,007283	HSP26-like protein	P15992	6		86
187	8	-	4,141	0,039145	Adh4	P10127	8		803
201	12	-	2,082	0,006377	Tpi1	P00942	6	31	646

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 11: Identifikacija diferencialno izraženih proteinov celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* v različnih šaržah fermentacije

Št. 2-D lis	Δ^a	Raven izražanja ^b	R ^c	P ^d	Ime proteina ^e	Pristopna št. ^f	PM ^g	SC (%) ^h	Seštevek ⁱ
205	8	-	2,307	0,024996	Eno1	P00924	13		1076
226	12	-	2,365	0,005913	Tdh3 ^j	P00359	10		256
238	8	-	2,176	0,08824	Adh4	P10127	12		4296
245	12	+	2,483	0,004272	veriga A Gpm1	P00950	2		28
247	12	+	3,251	0,004082	Eno1p	P00924	6		76
557	14				YNL209Wp-like protein	P40150	16		367

^a Δ - generacija pri kateri pride do signifikantne spremembe glede na referenco (v našem primeru prva šarža fermentacije)

^b zvišanje (+) oz. znižanje (-) ravni izražanja proteina glede na referenco

^c R – razmerje vrednosti normaliziranih volumnov, izračunano s programom 2-D Dymension (posamezna generacija/generacija 1 (referenčni gel))

^d p – Studentov t-test je bil izveden za preveritev statistične značilnosti diferencialne ravni proteina glede na referenco

^e identifikacija 2-D lis na podlagi masne spektrometrije (Univerza York)

^f pristopna številka v UniProt podatkovni bazi

^g PM - število ujemanih peptidov najvišjega zadetka

^h SC - odstotek v pokritosti aminokislinske sekvence ujemanih peptidov v identificiranem proteinu

ⁱ MASCOT "score" za najvišji, najbolj značilen zadetek

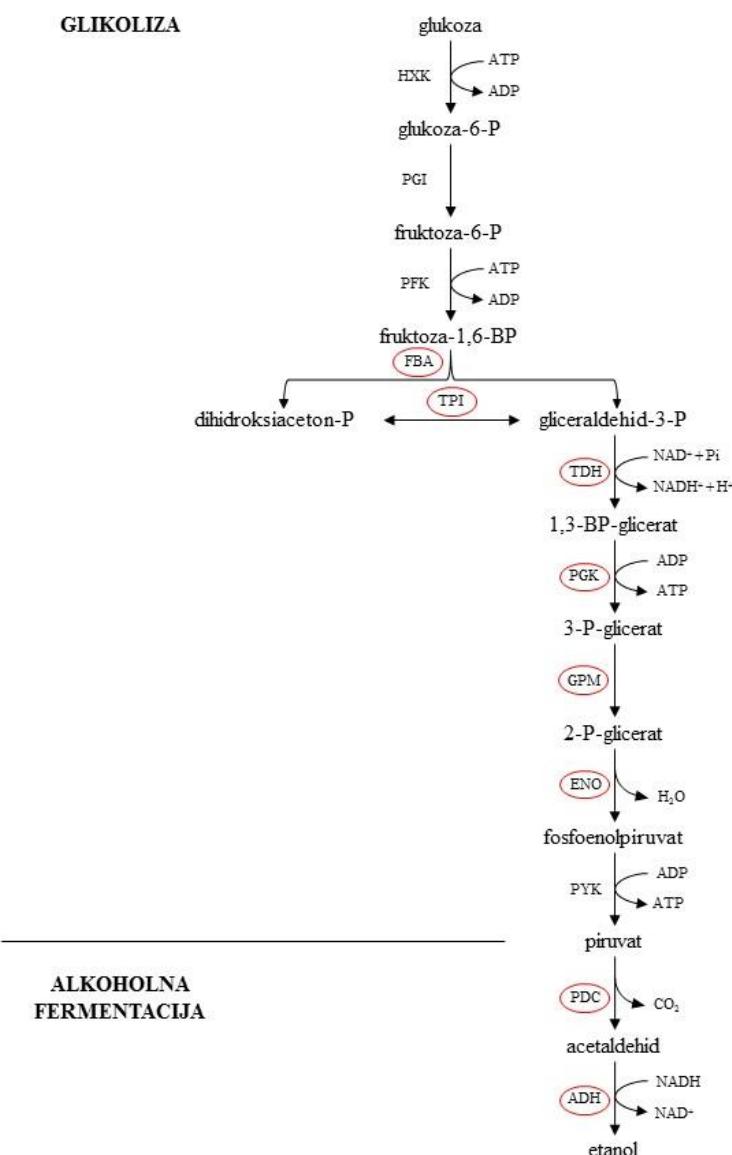
^j najverjetnejša identiteta proteina

Po identifikaciji smo proteinom določili glavno metabolno pot, v katero so vključeni, poleg tega pa tudi ostale znane vloge (Priloga G). Podatki so povzeti glede na razvrstitev v podatkovni bazi KEGG (Kanehisa in sod., 2015). Večina identificiranih proteinov je udeležena v procesu glikolize oz. glukoneogeneze, in sicer je njihova vloga metabolizem ogljikovih hidratov, ki so pomemben vir hrani in energije za rast in normalno delovanje kvasovk. Med glikolizo nastajajo intermediati, ki so del kompleksnega metabolizma kvasovk in so udeleženi tudi v drugih metabolnih poteh. Intermediati so posledično izhodne spojine pri biosintezi amino kislin, metabolizmu lipidov, razgradnji RNA, v pentoza-fosfatni poti itd.

Identificirali pa smo tudi nekaj proteinov, ki niso vpleteni v proces glikolize. Protein aktin (Act1) je evolucijsko zelo ohranjen protein, izražen v vseh evkariotskih celicah. Sodeluje pri celični gibljivosti in je strurni gradnik citoskeleta (The UniProt Consortium, 2015). Encim glicerol-1-fosfat fosfohidrolaza (Gpp1) ima vlogo v metabolizmu lipidov. Ribosomalna 40S podenota proteina S0A (RpS0A) sodeluje pri translaciji, medtem ko YNL209W-podoben protein sodeluje pri transkripciji, prav tako pa tudi pri procesiranju proteinov v endoplazmatskem retikulumu in pri endocitozi. Protein topotnega šoka 26 (Hsp26) je pomemben pri procesiranju proteinov v endoplazmatskem retikulumu, njegova vloga pa je

tudi skrb za pravilno zvijanje in razvrščanje proteinov ter razgradnjo napačno sintetiziranih proteinov. Gvanin nukleotid-vezavna proteinska podenota β (Asc1) je udeležena v biogenezi mRNA.

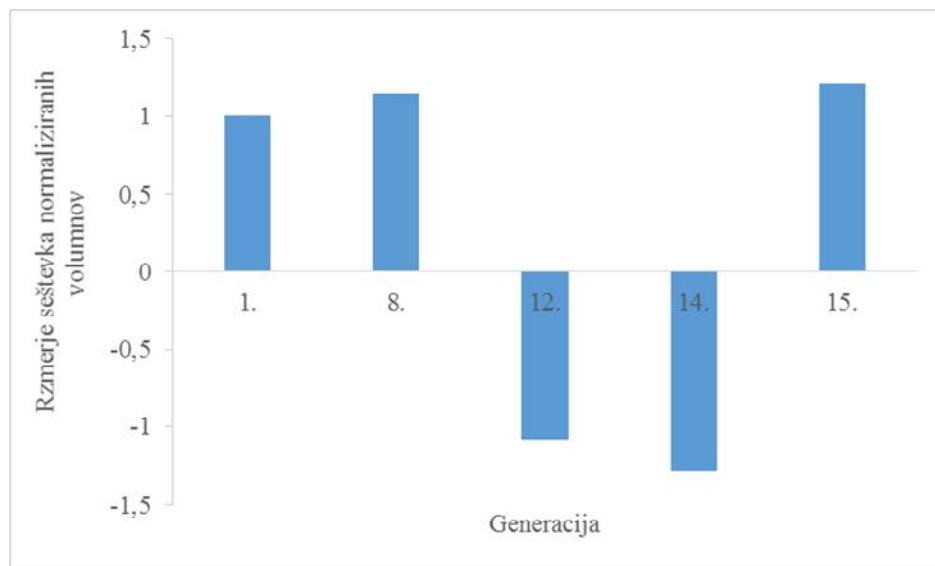
Večina identificiranih proteinov je, sodeč po razvrstitvi v podatkovni bazi KEGG, udeležena v procesu glikolize. Na sliki 13 sta prikazani glikoliza in alkoholna fermentacija, z rdečo barvo so obkroženi proteini, ki smo jih identificirali v našem poskusu.



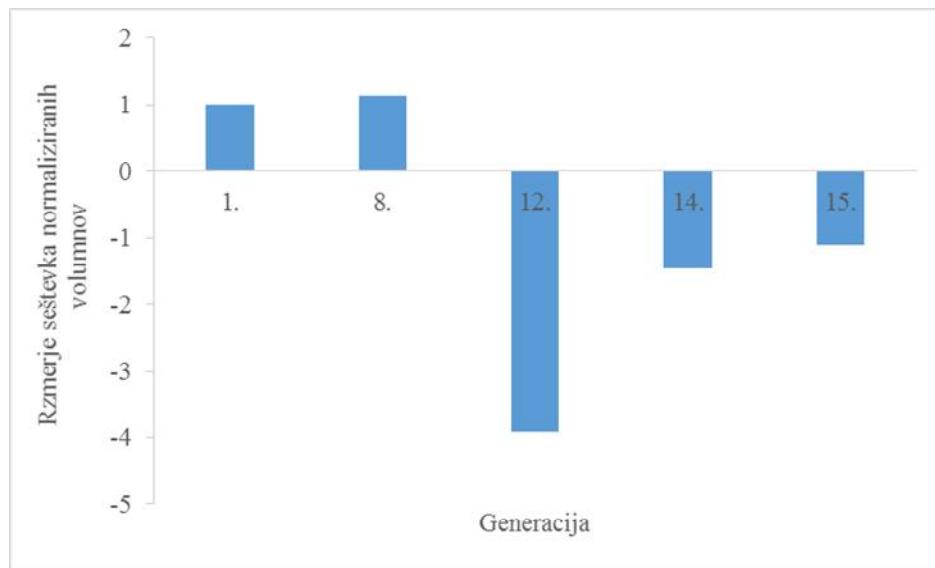
Slika 13: Prikaz glikolize in alkoholne fermentacije pri pivski kvasovki *Saccharomyces pastorianus* z označenimi identificiranimi proteini (rdeče obkroženi)

V nadaljevanju smo proteine (encime) razdelili v skupine glede na klasifikacijo Mednarodne zveze za biokemijo in molekularno biologijo (International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB). Sistematska klasifikacija encime razvršča v 6 razredov glede na vrsto reakcije, ki jo katalizirajo, ti pa se delijo še na posamezne podskupine. V našem primeru se encimi pojavljajo predvsem iz petih razredov. V največjem deležu se pojavljajo encimi iz razreda liaz, in sicer v 46 %. Sledijo encimi iz razredov oksidoreduktaz in izomeraz (18 %), encimi razredov transferaz in hidrolaz pa se pojavijo v 9 % (Priloga H).

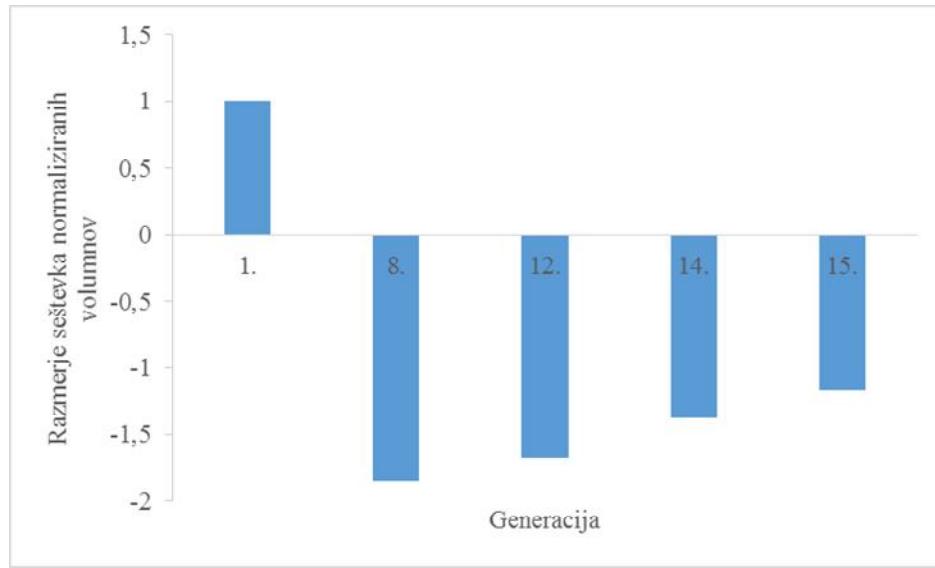
Kot že omenjeno, smo pri nekaterih identificiranih proteinih opazili, da se pojavljajo v večih 2-D lisah. To je značilno predvsem za tri proteine, in sicer: enolaza, fosfopiruvat hidrataza in alkohol dehidrogenaza. Za vse tri smo zato prikazali spreminjanje intenzitete (normaliziranega volumna) posameznih oblik po generacijah (Priloge J-L). Na slikah 14-16 pa smo grafično prikazali razmerje seštevka normaliziranih volumnov vseh oblik za posamezno generacijo glede na referenco (generacija 1).



Slika 14: Prikaz spreminjanja razmerja seštevka normaliziranih volumnov posameznih oblik Eno1 po generacijah glede na referenco (generacija 1)



Slika 15: Prikaz spremenjanja razmerja seštevka normaliziranih volumnov posameznih oblik Eno2 po generacijah glede na referenco (generacija 1)



Slika 16: Prikaz spremenjanja razmerja seštevka normaliziranih volumnov posameznih oblik Adh4 po generacijah glede na referenco (generacija 1)

5 RAZPRAVA

Za učinkovito varjenje piva so potrebni pogoji, ki zagotavljajo proizvodnjo kakovostnega piva in hkrati ohranjajo vitalnost kvasovk. Med procesom fermentacije so kvasovke izpostavljene številnim stresnim dejavnikom okolja, ki se med samim procesom stalno spreminja (Gibson in sod., 2007; Smart, 2007). Kakovost končnega proizvoda je tako odvisna od sposobnosti kvasovk, da se prilagodijo na spreminjače se okolje, zlasti v šaržnem procesu fermentacije, ki vključuje recikliranje (ponovno nacepitev) ene same kvasne kulture vrsto fermentacij (generacij). Biomaso iz prejšnje generacije po koncu fermentacije zberejo in uporabijo za novo (*ang. serial repitching*) tako, da jo inokulirajo v svežo pivino. Gre za proces, ki je značilen za pivovarstvo (Gibson in sod., 2007).

Pri magistrskem delu smo spremljali proteinski profil pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* skozi različne zaporedne šarže fermentacije. Želeli smo ugotoviti vzorec spremenjanja diferencialno izraženih proteinov skozi generacije kvasovk (1., 8., 12., 14. in 15.) in jih identificirati, saj smo mnenja, da bi bili diferencialno izraženi proteini primerni biomarkerji za sledenje uspešnosti fermentacije v zaporednih šaržah.

Po pregledu in analizi gelov različnih generacij smo opazili spremenjanje proteinskega profila med generacijami (Slika 7, Priloge B-F). Do statistično značilnih sprememb je prišlo pri generacijah 12 in 14, kjer se je raven večine diferencialnih proteinov znižala glede na generacijo 1 (Priloga A), v ostalih generacijah pa lahko opazimo trend upadanja izražanja do generacij 12-14. Nato pa se proti končni generaciji trend izražanja postopoma spet zvišuje.

Vzrok za spremenjanje proteinskega profila po generacijah je najverjetneje povezan s spremembami, ki se zgodijo ob inokulaciji kulture kvasovke v pivino. Na začetku starter kulturo v laboratoriju namnožijo do ustrezne celične gostote in jo nato nacepijo v pivino. Kvasovke so tako nenadoma izpostavljene povsem novemu okolju: visoke konc. hrani (predvsem sladkorjev), sprememba temperature, vrednosti pH, kar zanje predstavlja stres. Kvasovka metabolne procese usmeri v ohranjanje viabilnosti in premagovanje stresa, kar je energetsko potraten proces. Inducira se stresni odgovor, vlaganje energije v sintezo stresnih proteinov. Za vse organizme, ki so izpostavljeni stresnim pogojem v okolju, je namreč značilen skupen molekularni odgovor, ki je okarakteriziran z izrazito spremembou v izražanju genov, kar ima za posledico povečano sintezo družine polipeptidov, ki jih imenujemo proteini toplotnega šoka ali stresni proteini (Vanmuylde in sod., 1998). Kobi in sod. (2004) so pokazali, da je povečana raven stresnih proteinov (Hsp26p, Ssa4p, Pnc1p) odgovorna za vzdrževanje celične viabilnosti med generacijskim precepljanjem, kar nakazuje, da generacijsko precepljanje kulture predstavlja precejšen stres pivskim kvasovkam. V našem primeru jih nismo zaznali kot diferencialno izraženih, najverjetneje zato, ker smo proteinske profile primerjali na 1. generacijo, kjer se njihova raven že poveča in se verjetno vzdržuje čez

nadaljnje šarže, kar je pomembno pri vsakokratnem soočenju kulture s svežo pivino. Za potrditev te domneve, bi morali njihovo raven izražanja primerjati z laboratorijsko kulturo. Smo pa zaznali povečan trend izražanja proteina Hsp26 skozi vse generacije (razen v 12. generaciji), za katerega je znano, da je izražanje pogojeno z izpostavljenostjo široki paleti stresnih dejavnikov, vključno z dejavniki do katerih pride med tipično fermentacijo, kot so vstop v stacionarno fazo ali diaukični premik (Puig in Pérez-Ortin, 2000), etanolni stres (Piper in sod., 1994), osmotski stres (Blomberg, 1997), toplotni šok (Piper in sod., 1994) in izpostavljenost šibkim kislinam (Nobel in sod., 2001). Kobi in sod. (2004) so dokazali, da je povečana raven proteina Hsp26 med prvo fermentacijo značilna za prilagoditev na anaerobne pogoje, kar nakazuje, da prehod iz oksidativnega na fermentativni metabolizem predstavlja stres za kvasovko.

Poleg proteinov stresnega odgovora smo opazili spremembe v profilu tudi pri glikolitičnih encimih. Po inokulaciji kvasovk v pivino je namreč ključnega pomena hitra prilagoditev na novo okolje in hiter preklop na fermentativni metabolizem. V generacijah 12 in 14 se je, v primerjavi s 1. generacijo, njihova raven znižala, kar verjetno kaže na manjše vlaganje energije v vzdrževanje celic oz. stresne odgovore in s tem hitrejše prilagajanje kulture na svežo pivino. Gre za spremembe okolja, katerim je bila kultura v preteklosti že izpostavljena.

Pri generaciji 12 pride do občutno znižane ravni proteina Hsp26. Kvasovke se skozi generacije najverjetneje postopoma prilagajajo na okolje in se do generacije 12 že povsem prilagodijo na dane razmere, zato niti ni potrebe po sintezi proteinov stresnega odziva.

Med diferencialno izraženimi proteini smo identificirali tudi protein, podoben YNL209Wp imenovan tudi protein toplotnega šoka Ssb2, ki smo ga zaznali le v končnih preučevanih generacijah. Protein Ssb2 sodi v družino Hsp70, ki je evolucijsko zelo dobro ohranjena. Ti蛋白 delujejo kot molekularni šaperoni in naj bi imeli vlogo pri pravilnem zvijanju na novo sintetiziranih polipeptidnih verig ter pri preprečevanju agregacije oz. napačnega zvijanja proteinov (Cherry in sod., 2012). Omenjeni protein se pojavi v generaciji 14 in se ohrani do zadnje preučene generacije, kar je zaradi vloge pri pravilnem zvijanju proteinov tudi pričakovano.

Generacijsko precepljanje lahko vodi tudi v slabši fitnes kvasovk. Boulton (2013) s tem povezuje sledeče dejavnike: velikost fermentacijske posode, povišana temperatura fermentacije kot tudi usedline drozganja in drugi ne-kvasni delci, ki se vedno pojavijo v sedimentirani biomasi pri pivu spodnjega vrenja. Povečan delež le-teh lahko vpliva na nedoslednost pri nadalnjem precepljanju biomase. Poleg tega so posamezne kvasovke podvržene staranju, kar vpliva na njihovo uspešnost fermentacije. Starejše celice so predvidoma manj uspešne pri procesu fermentacije kot mlajše, vitalnejše celice. Način zbiranja sedimentirane biomase lahko tako vpliva na izvedbo fermentacije tekom kasnejših

generacij. Kvasne celice so tudi genetsko nestabilne in z generacijskim precepljanjem se lahko pojavijo mutacije in posledično napake na proteinih, ki se lahko kopijo med generacijami in prenašajo na hčerinske celice. Zato celice povečajo sintezo stresnih proteinov, ki te napake omilijo. V našem primeru se je v generaciji 15 občutno povečala raven Hsp26, kar še dodatno nakazuje na spremembe, ki so jim izpostavljene kvasovke. Jenkins in sod. (2009) so glavni vzrok za nastanek napak pripisali nestabilnosti mtDNA, ki je posledica zaporednega precepljanja kvasne biomase vrsto generacij, kar poveča možnost nastanka petit mutant.

V generaciji 15 je bila poleg proteina Hsp26, ponovno opazna nekoliko povišana raven glikolitičnih proteinov, kar bi lahko povezali s ponovnimi stresnimi razmerami in indukcijo stresnega odgovora, ki je potreben za popravilo napak/poškodb celičnih komponent, ki se kopijo tekom generacij. Zato menimo, da kvasne celice sintetizirajo večje število proteinov, ki služijo temu, da kljub morebitnim napakam pri njihovem izražanju oz. sintezi, zagotovijo optimalno delovanje vseh celičnih procesov, kar pa je energetsko potratno.

V splošnem so rezultati težko primerljivi z rezultati ostalih raziskovalcev, saj se študije med seboj močno razlikujejo v eksperimentalnih parametrih (uporabljen sev kvasovk, sestava pivine, fermentacijski pogoji) (Olesen in sod., 2002, James in sod., 2003, Kobi in sod., 2004, Brejning in sod., 2005, Gibson in sod., 2008). Pomemben dejavnik pa predstavlja tudi vzorčenje biomase. Po končani fermentaciji kvasne celice flokulirajo in postopno sedimentirajo na dno fermentacijske posode. Hodgson in sod. (1997) so mnenja, da naj bi bila stopnja sedimentacije posamezne celice ovisna od njene replikacijske starosti, zato v sedimentirani biomasi pride do razlik v sestavi celične populacije. Starejše celice se tako kopijo na dnu fermentacijske posode, zato lahko vzorčenje prav tako vpliva na rezultate.

Nekateri proteini so bili na gelu prisotni na večih mestih. Predvsem to velja za proteine Eno1 (6 od skupno 33 identificiranih diferencialno izraženih proteinov), Eno2 (9 od skupno 33 identificiranih diferencialno izraženih proteinov) in Adh4 (5 od skupno 33 identificiranih diferencialno izraženih proteinov). To nakazuje na različne izoblike, posttranslacijske modifikacije ali alternativne oblike mRNA. Identificirani proteini se lahko med seboj razlikujejo glede na pI, kar nakazuje posttranslacijske modifikacije, lahko pa gre za razliko tako v pI kot tudi molekulski masi, kar je najverjetnejše posledica fragmentacije proteinov, zaradi vakuolarne ali proteasomske razgradnje (Trabalzini in sod., 2003). Velik del regulacije ekspresije genov je namreč na posttranslacijski ravni (Daran-Lapujade in sod., 2007). Posttranslacijske modifikacije delujejo kot zelo vsestranska stikala, ki regulirajo aktivnost proteinov, njihovo koncentracijo in subcelično lokalizacijo ter vzdržujejo homostazo v celici (Swaney in sod., 2013). Lahko vplivajo na proteine vpletene v celični metabolizem, njihovo sintezo in zvijanje, in posledično regulirajo različne celične procese.

Za omenjene proteine smo zato prikazali normalizirane volumne posameznih oblik po generacijah neodvisno od reference (generacija 1) in s tem pridobili jasnejšo sliko o dejanskem izražanju posameznih izoblik. Normalizirane volumne smo nato sešteli (po generacijah) in jih primerjali glede na referenco (Priloge I-L). Tako smo dobili podatek o celokupnem izražanju posameznega proteina.

Ko smo sešteli normalizirane volumne posameznih oblik proteina Adh4 po posameznih generacijah in jih primerjali z referenčno generacijo (generacija 1), smo ugotovili, da se trend izražanja v omenjenih generacijah občutno zniža, glede na 1. generacijo, vendar ostaja na bolj ali manj enaki ravni, če izvzamemo 1. generacijo. Vendar pa je Adh4 le ena izmed sedmih izoblik navedenih v literaturi (Adh1, Adh2, Adh3, Adh5, Adh6 ali Adh7), ki jih na našem gelu nismo zaznali kot diferencialno izražene ali niso bili identificirani.

Prisotnost encima piruvat dekarboksilaze (Pdc1) v visokih koncentracijah je pomembna za proizvodnjo etanola v anaerobnih pogojih, saj je odgovorna za pretvorbo piruvata v acetaldehid. Enakega pomena za alkoholno fermentacijo je encim alkohol dehidrogenaza (Adh4, ki je sicer le ena izmed sedmih izoblik), ki je v naslednjem koraku fermentacije odgovoren za pretvorbo acetaldehida v etanol (The UniProt Consortium, 2015). Dickinson in sod. (2003) so encima povezali tudi z razgradnjo amino kislin do kompleksnih alkoholov, kot sta 2-feniletanol in izoamil alkohol, ter posledično nastankom drugih aromatskih komponent, ki so prav tako pomembni metabolni produkti fermentacije. Višji alkoholi namreč prispevajo k edinstveni aromi piva. Kruckeberg in Dickinson (2004) sta ugotovila, da je encim Adh4 v večini laboratorijskih sevov prisoten le v zelo nizkih ravneh, v pivskih sevih pa je raven izražanja močno povišana. Zato bi bilo spremljanje njune aktivnosti lahko koristna metoda za nadzor procesa in spremljanje uspešnosti fermentacije.

V prihodnje bi bilo zanimivo preučiti, kako spremicanje proteinskega profila vpliva na aroma, okus in kvaliteto piva v posamezni šarži in kako se senzorične lastnosti le-tega spreminjajo po generacijah. Tako bi lahko ugotovili, kakšen vpliv imata generaciji 1 in 12 na lastnosti piva, saj pri njiju pride do največjih sprememb v proteinskem profilu. V ta namen bi bilo smiselno spremljati porabo sladkorjev in koncentracijo nastalega etanola in drugih alkoholov. Tako bi še lažje sledili uspešnosti fermentacije in izboljšali ključne korake za maksimalen izkupiček.

Eden izmed ciljev v prihodnosti je tudi izboljšanje začetne generacije (generacije 1) oz. izboljšanje prilagajanja kvasovk na nov rastni medij in nove pogoje. S tem bi skrajšali fazo prilagajanja, da bi kvasovke kar se da hitro po nacepitvi začele maksimalno delovati. To bi lahko dosegli tako, da bi že starter kulturo namnožili v pivini in bi bil šok ob prehodu v fermentacijsko posodo manjši. Kvasovke bi se hitreje prilagodile in začele z delovanjem. V ta namen bi bilo smiselno preučiti tudi, kako se spreminja proteinski profil v različnih fazah

fermentacije tekom generacij ter določiti kateri diferencialno izraženi proteini bi bili primerni za modificiranje in dodatno izboljšanje procesa.

Rezultati proteomske analize so v skladu z našimi pričakovanji, da se bo proteinski profil tekom zaporednih šarž spremenjal. Z raziskavo smo potrdili hipotezo, da so diferencialno izraženi proteini primerni biomarkerji za sledenje uspešnosti fermentacije v zaporednih šaržah. V raziskavi smo kot diferencialno izražene proteine identificirali predvsem glikolitične encime, ki imajo vlogo pri metabolni aktivnosti kvasovke, in stresne proteine, zato bi s spremeljanjem njihovega izražanja lahko nadzirali vitalnost kulture in posledično uspešnost fermentacije.

6 SKLEPI

Z raziskavo smo potrdili, da:

- se proteinski profil pivske kvasovke vrste *Saccharomyces pastorianus* spreminja tekom zaporednih šarž fermentacij,
- so diferencialno izraženi proteini primerni markerji za sledenje metabolne aktivnosti in stresnega odgovora v zaporednih šaržah, saj gre večinoma za glikolitične encime in stresne proteine,
- je do statistično značilnih sprememb prišlo pri generacijah 12 in 14, kjer se je raven večine proteinov znižala glede na generacijo 1,
- so kvasovke v 1. generaciji izpostavljene največjim spremembam, v 1. generaciji je bila raven glikolitičnih in stresnih proteinov povišana v primerjavi z ostalimi generacijami,
- se raven glikolitičnih in nekaterih stresnih proteinov v zadnji preučeni generaciji (15 generacija) spet poveča glede na predhodne generacije.

7 POVZETEK

Za uspešno in učinkovito varjenje piva so potrebni pogoji, ki zagotavljajo proizvodnjo kakovostnega piva in hkrati ohranjajo vitalnost kvasovk. Med fermentacijo so kvasovke izpostavljene številnim stresnim dejavnikom, vključno s spremenljivo temperaturo, izpostavljenostjo visokim koncentracijam hranil, kisika in etanola. Uspešnost fermentacije je zato odvisna od njihove sposobnosti prilagajanja na te spremembe, zlasti v šaržni proizvodnji, pri kateri isto kvasno kulturo ponovno nacepijo skozi več fermentacijskih generacij.

Pri magistrskem delu smo spremljali spreminjanje proteinskega profila pivske kvasovke vrste *Saccharomyces pastorianus* skozi različne zaporedne šarže fermentacije. Vzorce kvasne biomase za izvedbo poskusa smo pridobili v sodelovanju s Pivovarno Laško. Vzorci biomase so bili odvzeti v različnih zaporednih šaržah fermentacije (1., 8., 12., 14. in 15.) in sicer vedno po končanem procesu fermentacije. Iz kvasne biomase smo pripravili celični ekstrakt iz katerega smo očistili proteine z uporabo kompleta: "2-D Clean Up" kit. V nadaljevanju smo z dvo-dimenzionalno elektroforezo ločili proteine: v 1. dimenziji z IEF, v 2. dimenziji z SDS-PAGE. Za ločevanje proteinov smo uporabili komercialno pripravljene trakove z imobiliziranim pH gradientom (trakove IPG) s pH območjem 4-7. Po končani SDS-PAGE smo gele barvali z barvilom SYPRO RUBY in slike gelov analizirali v programu 2-D Dymension. Kot referenčni gel smo izbrali generacijo 1, ki nam je služila za primerjavo z ostalimi geli. Tako smo določili diferencialno izražene proteine in jih identificirali z masno spektrometrijo. Rezultati so pokazali spreminjanje proteinskega profila med generacijami. Do statistično značilnih sprememb je prišlo pri generacijah 12 in 14, kjer se je raven večine proteinov znižala glede na generacijo 1. Sicer pa smo lahko opazili trend upadanja izražanja do generacij 12-14, ki se proti končni generaciji postopoma zvišuje. Vzrok za spreminjanje proteinskega profila po generacijah je najverjetneje povezan s spremembami, ki se zgodijo ob inokulaciji kulture kvasovke v pivino. Kvasovke so nenadoma izpostavljene povsem novemu okolju, kar zanje predstavlja stres. Metabolne procese zato usmerijo v ohranjanje viabilnosti in premagovanje stresa, kar je energetsko potraten proces. Inducira se stresni odgovor (protein Hsp26) in poveča raven glikolitičnih encimov. Po inokulaciji kvasovk v pivino je namreč ključnega pomena hitra prilagoditev na novo okolje in hiter preklop na fermentativni metabolizem. V generacijah 12 in 14 se je, v primerjavi s 1. generacijo, njihova raven znižala, kar verjetno kaže na manjše vlaganje energije v vzdrževanje celic oz. stresne odgovore in s tem hitrejše prilagajanje kulture na svežo pivino. Kvasovke skozi generacije najverjetneje postopoma prilagodijo na okolje. V zadnji generaciji, ki smo jo spremljali (generacija 15), je poleg proteina Hsp26 ponovno opazna nekoliko povišana raven glikolitičnih proteinov. To bi lahko pripisali slabšemu fitnesu populacije kvasovk, ki bi lahko bil posledica napak/poškodb celičnih komponent, ki se kopijo tekom generacij, kot posledica stresnih razmer. Sklepamo, da se zaradi generacijskega precepljanja lahko nepopravljene napake in poškodbe v manjši meri prenašajo na hčerinske celice. Prav tako smo opazili, da so bili nekateri proteini na gelu

prisotni na večih mestih. To nakazuje na različne izooblike ali posttranslacijske modifikacije, lahko pa je to posledica fragmentacije proteinov. Rezultati nakazujejo, da bi bilo spremljanje aktivnosti encima Adh4 lahko koristna metoda za nadzor procesa in spremljanje uspešnosti fermentacije. Prisotnost encima Adh4 je namreč pomembna za proizvodnjo etanola v anaerobnih pogojih, prav tako pa je encim pomemben za nastanek kompleksnih alkoholov in drugih aromatskih komponent, ki so pomembni metabolni produkti fermentacije in prispevajo k edinstveni aromi piva.

Rezultati proteomske analize so pokazali, da diferencialno izraženi proteini sodijo večinoma v skupino glikolitičnih encimov in stresnih proteinov, zato bi s spremljanjem njihovega izražanja lahko spremljali vitalnost kulture in posledično uspešnost fermentacije.

8 VIRI

- Alexandre H., Rousseaux I., Charpentier C. 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. FEMS Microbiology Letters, 124, 1: 17-22
- Anderluh G., Maček P., Sepčić K., Turk T. 2009. Eksperimentalne metode v biokemiji. Ljubljana, Študentska založba: 81-90
- Anness B.J., Bamforth C.W. 1982. Dimethyl sulphide. Journal of the Institute of Brewing, 88, 4: 244-252
- Arcay-Ledezma G.J., Slaughter J.C. 1984. The response of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentation under carbon dioxide pressure. Journal of the Institute of Brewing, 90, 2: 81-84
- Attfield P.V. 1987. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. FEBS Letters, 225, 1-2: 259-263
- Ayres J.C., Orvin Mundt J., Sandine W.E. 1981. Microbiology of foods. San Francisco, W. H. Freeman and Company: 151-165
- Bai F.W., Anderson W.A., Moo-Young M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology Advances, 26, 1: 89-105
- Bamforth C.W. 2006. New brewing technologies: setting the scene. V: Brewing: new technologies. Bamforth C.W. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing: 1-2
- Bavec A., Zorko M., Stojan J. 2008. Navodila za laboratorijske vaje iz biokemije s teoretičnim dodatkom. Ljubljana, Študentska založba: 12-13
- Beckman K.B., Ames B.N. 1998. The free radical theory of aging matures. Physiological Reviews, 78, 2: 547-481
- Berggren K., Chernokalskaya E., Steinberg T.H., Kemper C., Lopez M.F., Diwu Z., Haugland R.P., Patton W.F. 2000. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. Electrophoresis, 21, 12: 2509-2521
- Berggren K.N., Schulenberg B., Lopez M.F., Steinberg T.H., Bogdanova A., Smejkal G., Wang A., Patton W.F. 2002. An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: Comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. Proteomics, 2, 5: 486-498

- Blomberg A. 1997. Osmoresponsive proteins and functional assessment strategie in *Saccharomyces cerevisiae*. Electrophoresis, 18, 8: 1429-1440
- Blomberg A., Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. Advances in Microbial Physiology, 33: 145-212
- Bokulich N.A., Bamforth C.W. 2013. The microbiology of malting and brewing. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 77, 2: 157-172
- Boulton C. 2013. Encyclopaedia of brewing. Oxford, John Wiley & Sons: 523-587
- Boulton C., Quain D. 2001. Brewing yeast and fermentation. Oxford, Blackwell Science: 585 str.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 1-2: 248-254
- Brejnning J., Arneborg N., Jespersen L. 2005. Identification of genes and proteins induced during the lag and early exponential phase of lager brewing yeasts. Journal of Applied Microbiology, 98, 2: 261-271
- Briggs D.E., Boulton C.A., Brookes P.A., Stevens R. 2004. Brewing: science and practice. Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 4-5, 18-18, 87-87
- Cabiscol E., Piulats E., Echave P., Herrero E., Ros J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 279, 35: 27393–27398
- Caesar R., Palmfeldt J., Gustafsson J.S., Pettersson E., Hossein Hashemi S., Blomberg A. 2007. Comparative proteomics of industrial lager yeast reveals differential expression of the *cerevisiae* and non-*cerevisiae* parts of their genomes. Proteomics, 7, 22: 4135-4147
- Canetta E., Adya A.K., Walker G.M. 2006. Atomic force microscopic study of the effects of ethanol on yeast cell surface morphology. FEMS Microbiology Letters, 255, 2: 308-315
- Casaregola S., Nguyen H.V., Lapathitis G., Kotyk A., Gaillardin C. 2001. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 1607-1618

Chatterjee M.T., Khalawan S.A., Curran B.P.G. 2000. Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology*, 146: 877-884

Cherry J.M., Hong E.L., Amundsen C., Balakrishnan R., Binkley G., Chan E.T., Christie K.R., Costanzo M.C., Dwight S.S., Engel S.R., Fisk D.G., Hirschman J.E., Hitz B.C., Karra K., Krieger C.J., Miyasato S.R., Nash R.S., Park J., Skrzypek M.S., Simison M., Weng S., Wong E.D. 2012. *Saccharomyces* genome database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 40: D700-D705

Civil M. 1964. A hymn to the beer goddess and a dringing song. V: Studies presented to A. Leo Oppenheim. Biggs R.D., Brinkman J.A. (eds.). Chicago, The Oriental Institute of the University of Chicago: 67-89

Coote N., Kirsop B.H. 1976. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 82, 3: 149-153

Crumplen R., D'Amore T., Slaughter C., Stewart G.G. 1993. Novel differences between ale and lager brewing yeasts. The Proceedings of the Congress of the European Brewery Convention, 24: 267-274

D'Amore T. 1992. Cambridge prize lecture improving yeast fermentation performance. *Journal of the Institute of Brewing*, 98, 5: 375-382

D'Amore T., Panchal C.J., Russell I., Stewart G.G. 1988. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology*, 2, 6: 365-372

Daran-Lapujade P., Rossell S., van Gulik W.M., Luttik M.A.H., de Groot M.J.L., Slijper M., Heck A.J.R., Daran J.M., de Winde J.H., Westerhoff H.V., Pronk J.T., Bakker B.M. 2007. The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 40: 15753-15758

Dawes I.W. 2004. Yeast stress responses. V: The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. 2nd ed. Dickinson J.R., Schweizer M. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 376-438

De Keukeleire. 2000. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*, 23, 1: 108-112

- Dickinson J.R., Salgado L.E.J., Hewlins M.J.E. 2003. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 278, 10: 8028-8034
- Donalies U.E.B., Nguyen H.T.T., Stahl U., Nevoigt E. 2008. Improvements of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking. V: Food biotechnology: Advances in biochemical engineering/biotechnology. Vol. 111. Scheper T., Stahl U., Donalies U.E.B., Nevoigt E. (eds.). Heidelberg, Springer: 67-98
- Faltings D. 1991. Die Bierbrauerei im Alten Reich. V: Zeitschrift für ägyptische Sprache und Altertumskunde. Bickel S., Fischer-Elfert H.W., Loprieno A., Richter T.S. (eds.). Leipzig, Universität Leipzig, Ägyptologisches Institut, 118, 2: 104-116
- Fernandes L., Côrte-Real M., Loureiro V., Loureiro-Dias M.C., Leão C. 1997. Glucose respiration and fermentation in *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid. Letters in Applied Microbiology, 25, 4: 249-253
- Gabris S., Lubec G., Fountoulakis M. 2005. Limitations of current proteomics technologies. Journal of Chromatography A, 1077, 1: 1-18
- Gibson B.R., Lawrence S.J., Boulton C.A., Box W.G., Graham N.S., Linforth R.S.T., Smart K.A. 2008. The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation. FEMS Yeast Research, 8, 4: 574-585
- Gibson B.R., Lawrence S.J., Leclaire J.P.R., Powell C.D., Smart K.A. 2007. Yeast responses to stress associated with industrial brewery handling. FEMS Microbiology Reviews, 31, 5: 535-569
- Girotti A.W. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. Journal of Lipid Research, 39, 8: 1529-1542
- Görg A., Klaus A., Lück C., Weiland F., Weiss W. 2007a. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. Laboratory manual. Freising, Technische Universität München: 67-87
- Görg A., Klaus A., Lück C., Weiland F., Weiss W. 2007b. Today's 2-D electrophoresis technology. V: HUPO 2007 Education program. October 6, 2007, Seoul. Montreal, HUPO: Human Proteome Organization: 14 str.

Hansen J., Kielland-Brandt M.C. 1994. *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional *MET2* alleles similar to homologues from *S. cerevisiae* and *S. monacensis*. *Gene*, 140, 1: 33-40

Hardwick W.A., van Oevelen D.E.J., Novellie L., Yoshizawa K. 1995. Kinds of beer and beerlike beverages. V: *Handbook of brewing*. Hardwick W.A. (ed.). New York, Marcel Dekker: 53-86

Haukeli A.D., Lie S. 1978. Conversation of α -acetolactate and removal of diacetyl - a kinetic study. *Journal of the Institute of Brewing*, 84, 2: 85-89

Hodgson J., Pinder A., Catley B.J., Deans K. 1999. Effects of cone cropping and serial re-pitch on the distribution of cell ages in brewery yeast. *Master Brewers Association of the Americas*, 36, 2: 175-177

Hornsey I. 2013. *Brewing*. 2nd ed. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 332 str.

Hottiger T., Boller T., Wiemken A. 1987. Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Letters*, 220, 1: 113-115

Hough J.S. 1985. *The biotechnology of malting and brewing*. Cambridge, Cambridge University Press: 1-6, 19-40, 73-92

Hulse G.A. 2003. Yeast propagation. V: *Brewing yeast fermentation performance*. 2nd ed. Smart K. (ed.). Oxford, Blackwell Science: 251-256

Ilett D.R. 1995. Aspects of the analysis, role and fate of sulphur dioxide in beer. *Master Brewers Association of the Americas: Technical Quarterly*, 32, 4: 213-221

James T.C., Campbell S., Donnelly D., Bond U. 2003. Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 3: 432-448

Jamnik P., Raspor P. 2008. Proteomika v prehrani. V: *Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost*. 31. januar in 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 45-51

Jenkins C.L., Lawrence S.J., Kennedy A.I., Thurston P., Hodgson J.A., Smart K.A. 2009. Incidence and formation of petite mutants in lager brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* (syn. *S. pastorianus*) populations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 67, 2: 72-80

Jespersen L., Cesar L.B., Meaden P.G., Jakobsen M. 1999. Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2: 450-456

Joubert R., Brignon P., Lehmann C., Monribot C., Gendre F., Boucherie H. 2000. Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. *Yeast*, 16, 6: 511-522

Kanehisa M., Sato Y., Kawashima M., Furumichi M., Tanabe M. 2015. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44: D457-D462

Kobi D., Zugmeyer S., Potier S., Jaquet-Gutfreund L. 2004. Two-dimensional protein map of an "ale"-brewing yeast strain: proteome dynamics during fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5, 3: 213-230

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 249-249

Križaj I. 2008. Metode za analizo proteoma. V: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost. 31. januar in 1. februar 2008. Raspor P., Jamnik P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-31

Kruckeberg A.L., Dickinson J.R. 2004. Carbon metabolism. V: The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. 2nd ed. Dickinson J.R., Schweizer M. (eds.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group: 42-103

Lai L.C., Kosorukoff A.L., Burke P.V., Kwast K.E. 2005. Dynamical remodeling of the transcriptome during short-term anaerobiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: differential response and role of Msn2 and/or Msn4 and other factors in galactose and glucose media. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 10: 4075-4091

Larsen M.R., Larsen P.M., Fey S.J., Roepstorff P. 2001. Characterization of differently processed forms of enolase 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 22, 3: 566-575

Lewis M.J., Young T.W. 2001. Brewing. 2nd ed. New York, Springer Science & Business Media: 3-10

Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampario J.P. 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 35: 14539-14544

- Lloyd D., Morrell S., Carlsen H.N., Degn H., James P.E., Rowlands C.C. 1993. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 9, 8: 825-833
- Lubec G., Krapfenbauer K., Fountoulakis M. 2003. Proteomics in brain research: potentials and limitations. Progress in Neurobiology, 69, 3: 193-211
- Mackenzie K.F., Singh K.K., Brown A.D. 1988. Water stress plating hypersensitivity of yeast: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, 134, 6: 1661-1666
- MacLeod A.M. 1977. Beer. V: Economic microbiology: Vol. 1. Alcoholic beverages. Rose A.H. (ed.). London, Academic Press: 50-51, 73-73
- MacWilliam I.C. 1968. Wort composition – a review. Journal of the Institute of Brewing, 74, 1: 38-54
- Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. 2009. Brock biology of microorganisms. 12th ed. San Francisco, Pearson Education, Pearson Benjamin Cummings: 357-357, 752-752
- Mansure J.J., Panek A.D., Crowe L.M., Crowe J.H. 1994. Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes, 1191, 2: 309-316
- Martinez-Pastor M.T., Marchler G., Schüller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). EMBO Journal, 15, 9: 2227-2235
- Marza E., Camougrand N., Manon S. 2002. Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization. FEBS Letters, 521, 1-3: 47-52
- Mizoguchi H., Hara S. 1997. Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid. Journal of Fermentation and Bioengineering, 83, 1: 12-16
- Morimoto R.I., Kroeger P.E., Cotto J.J. 1996. The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. Experientia Supplementum, 77: 139-163
- Nelson D.L., Cox M.M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. 3rd ed. New York, Worth Publishers: 544-544

- Nobel H., Lawrie L., Brul S., Klis F., Davis M., Alloush H., Coote P. 2001. Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 18, 15: 1413-1428
- O'Connor-Cox E., Ingledew W.M. 1989. Wort nitrogenous sources-their use by brewing yeast. Journal of American Society of Brewing Chemists, 47: 102-108
- O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. Journal of Biological Chemistry, 250, 10: 4007-4021
- Olesen K., Felding T., Gjermansen C., Hansen J. 2002. The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during a production-scale lager beer fermentation. FEMS Yeast Research, 2, 4: 563-573
- O'Toole D.K., Lee Y.K. 2006. Food involving yeast and ethanol fermentation. V: Microbial biotechnology: principles and applications. 2nd ed. Lee Y.K. (ed.). Singapore, World Scientific Publishing: 293-308
- Panek A. 1963. Function of trehalose in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Archives of Biochemistry and Biophysics, 100, 3: 422-425
- Pascual C., Alonso A., Garcia I., Romay C., Kotyk A. 1988. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 32, 3: 374-378
- Pasteur L. 1860. Mémoire sur la fermentation alcoolique. Annales de Chimie et de Physique, 58: 323-426
- Piper W.P., Talreja K., Panareton B., Moradas-Ferreira P., Byrne K., Praekelt U.M., Meacock P., Récnanq M., Boucherie H. 1994. Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. Microbiology, 140: 3031-3038
- Pires E., Brányik T. 2015. Biochemistry of beer fermentation. Heidelberg, Springer: 1-10
- Powell C.D., Quain D.E., Smart K.A. 2003. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. FEMS Yeast Research, 3, 2: 149-157
- Puig S., Pérez-Ortin J.E. 2000. Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift. Yeast, 16, 2: 139-148

Rabilloud T., Chevallet M., Luche S., Leize-Wagner E. 2005. Oxidative stress response: a proteomic view. Expert Review of Proteomics, 2, 6: 949-956

Rainieri S., Kodama Y., Kaneko Y., Mikata K., Nakao Y., Ashikari T. 2006. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. Applied and Environmental Microbiology, 72, 6: 3968-3974

Ruis H., Schüller C. 1995. Stress signaling in yeast. BioEssays, 17, 11: 959-965

Salmon T.B., Evert B.A., Song B., Doetsch P.W. 2004. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acid Research, 32, 12: 3712-3723

Samuel D. 1996. Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. Science, 273: 488-490

Schmitt A.P., McEntee K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 12: 5777-5782

Sicard D., Legras J.L. 2011. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Comptes Rendus Biologies, 334, 3: 229-236

Simola M., Hänninen A.L., Stranius S.M., Makarow M. 2000. Trehalose is required for conformational repair of heat-denatured proteins in the yeast endoplasmic reticulum but not for maintenance of membrane traffic functions after severe heat stress. Molecular Microbiology, 37, 1: 42-53

Singer M.A., Lindquist S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. Molecular Cell, 1, 5: 639-648

Smart K.A. 2007. Brewing yeast genomes and genome-wide expression and proteome profiling during fermentation. Yeast, 24, 11: 993-1013

Sola-Penna M., Meyer-Fernandes J.R. 1998. Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? Archives of Biochemistry and Biophysics, 360, 1: 10-14

Stevens J.F., Page J.E. 2004. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65, 10: 1317-1330

Suthko M.L., Vilpola A., Linko M. 1993. Pitching rate in high gravity brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 99, 4: 341-346

Swaney D.L., Beltrao P., Starita L., Guo A., Rush J., Fields S., Krogan N.J., Villén J. 2013. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation crosstalk in protein degradation. *Nature Methods*, 10, 7: 676-682

SYPRO® Ruby protein gel stain: product information. 2007. Oregon, Molecular Probes™,
Ivivrogen detection technologies: 1-7:
<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp12000.pdf> (april 2015)

Tamai Y., Momma T., Yoshimoto H., Kaneko Y. 1998. Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast*, 14, 10: 923-933

Tamang J.P., Samuel D. 2010. Dietary cultures and antiquity of fermented foods and beverages. V: Fermented foods and beverages of the world. Tamang J.P., Kailasapathy K. (eds.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group: 1-40

The UniProt Consortium. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43: D204-D212

Trabalzini L., Paffetti A., Scaloni A., Talamo F., Ferro E., Coratza G., Bovalini L., Lusini P., Martelli P., Santucci A. 2003. Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 370: 35-46

van der Merwe A.I., Friend J.F.C. 2002. Water management at a malted barley brewery. *Water SA*, 28, 3: 313-318

Vanmuydler N., Evrard L., Coremans-Pelseneer J., Dourov N. 1998. Stress proteins: expression of a universal phenomenon of cell defense. *Revue Medicale de Bruxelles*, 19, 2: 61-67

Verstrepen K.J., Van Laere S.D.M., Vanderhaegen B.M.P., Derdelinckx G., Dufour J.P., Pretorius I.S., Winderickx J., Thevelein J.M., Delvaux F.R. 2003. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 5228-5237

- Vidgren V., Multanen J.P., Ruohonen L., Londesborough J. 2010. The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. FEMS Yeast Research, 10, 4: 402-411
- Walther A., Hesselbart A., Wendland J. 2014. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. G3: Genes, Genomes, Genetics, 4, 5: 783-793
- Westermeier R. 2001. Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. 3rd ed. Weinheim, Wiley: 7-40
- Willaert R. 2007. The beer brewing process: Wort production and beer fermentation. V: Handbook of food products manufacturing. Vol. 1. Hui Y.H. (ed.). New Jersey, John Wiley & Sons: 469-474
- Yokoi S., Tsugita A., Kamada K. 1988. Characterisation of major proteins and peptides in beer. Journal of American Society of Brewing Chemists, 46: 99-103
- Young T.W. 2015. Beer. V: Encyclopædia Britannica Online. Chicago, Encyclopædia Britannica: 9 str.
<http://www.britannica.com/topic/beer> (marec 2015)
- Zheng X.T., D'Amore T., Russell I., Stewart G.G. 1994. Factors influence maltotriose utilization during brewery wort fermentations. Journal of American Society of Brewing Chemists, 52: 41-47

ZAHVALA

Rada bi se zahvalila vsem, ki so me spremljali skozi vsa leta študija in mi pomagali ter me spodbujali na poti do cilja.

Najprej bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Poloni Jamnik za ves čas in trud, ki mi ga je namenila pri nastanku tega magistrskega dela. Hvaležna sem za vse strokovne nasvete in razprave, prav tako pa za sproščene pogovore in vzpodbudne besede, zaradi katerih sem z veseljem opravljala raziskovalno delo.

Recenzentki doc. dr. Maši Vodovnik se zahvaljujem za strokoven in temeljit pregled magistrskega dela.

Zahvala gre tudi mag. Tomažu Požrli za strokovno razpravo o magistrskem delu, ki mi je odprla nov pogled in mi razjasnila marsikatero vprašanje.

Hvala Nejcu za podporo. Hvala, ker me ves čas spodbujaš in verjameš vame. S tabo je vsak dan lepši.

Hvala Ireni in Vinku Krajnik za spodbudo.

Posebna zahvala gre moji družini. Hvala ker me brezpogojno podpirate na moji poti, za vse vzpodbudne besede tekom študija in pomoč pri uresničitvi zadanih ciljev. Hvala ker mi stojite ob strani.

Hvala tudi sošolkam Andreji, Mateji in Tinci za zabavna in sproščena študentska leta.

PRILOGE

Priloga A: Prikaz ravni izražanja celokupnih proteinov vzorcev pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* glede na generacijo 1 (referenca) skupaj z rezultati statistične analize sprememb proteoma (Studentov t-test)

Št. 2-D lise	Nor. V.R. ^a	Generacija 1					Generacija 8					Generacija 12					Generacija 14					Generacija 15				
		t vs. 8	t vs. 12	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V .R. ^a	t vs. 1	t vs. 12	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V .R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V .R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 12	t vs. 15	Nor.V .R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 12	t vs. 14	
17	1	0,017	0,014	0,032	0,484	1,784	0,017	0,009	0,001	0,051	-9,747	0,014	0,009	0,019	0,014	-1,504	0,032	0,001	0,019	0,042	1,122	0,484	0,051	0,014	0,042	
19	1	0,027	/	0,135	0,015	1,541	0,027	/	0,627	0,045	/	/	/	/	/	1,438	0,135	0,627	/	0,089	2,314	0,015	0,045	/	0,089	
25	1	0,619	0,021	0,063	0,369	1,035	0,619	0,019	0,019	0,424	-5,856	0,021	0,019	0,028	0,021	-1,327	0,063	0,019	0,028	0,083	1,188	0,369	0,424	0,021	0,083	
34	1	0,043	0,012	0,443	0,109	1,696	0,043	0,004	0,001	0,635	-5,186	0,012	0,004	0,008	0,008	-1,121	0,443	0,001	0,008	0,044	1,594	0,109	0,635	0,008	0,044	
41	1	0,177	0,018	0,140	0,547	1,251	0,177	0,012	0,044	0,052	-4,165	0,018	0,012	0,031	0,016	-1,375	0,140	0,044	0,031	0,135	-1,073	0,547	0,052	0,016	0,135	
43	1	0,010	0,000	0,001	0,876	1,384	0,010	0,000	0,002	0,128	-7,840	0,000	0,000	0,000	0,003	-1,512	0,001	0,002	0,000	0,065	1,028	0,876	0,128	0,003	0,065	
49	1	0,436	0,014	0,036	0,370	-1,143	0,436	0,017	0,055	0,634	-4,154	0,014	0,017	0,040	0,043	-1,902	0,036	0,055	0,040	0,223	-1,276	0,370	0,634	0,043	0,223	
52	1	0,129	0,019	0,073	0,093	-1,316	0,129	0,023	0,186	0,344	-3,715	0,019	0,023	0,046	0,033	-1,629	0,073	0,186	0,046	0,491	-1,468	0,093	0,344	0,033	0,491	
56	1	0,030	0,011	0,313	0,149	1,902	0,030	0,004	0,023	0,002	-5,941	0,011	0,004	0,007	0,006	1,193	0,313	0,023	0,007	0,366	1,293	0,149	0,002	0,006	0,366	
57	1	0,021	0,358	0,117	0,098	6,955	0,021	0,006	0,003	0,001	-1,552	0,358	0,006	0,025	0,021	2,141	0,117	0,003	0,025	0,404	2,304	0,098	0,001	0,021	0,404	
59	1	0,037	/	0,072	0,117	2,984	0,037	/	0,047	0,049	/	/	/	/	/	1,958	0,072	0,047	/	0,264	1,732	0,117	0,049	/	0,264	
72	1	0,229	0,010	0,223	0,790	-1,423	0,229	0,004	0,950	0,025	-7,821	0,010	0,004	0,003	0,002	-1,418	0,223	0,950	0,003	0,011	1,041	0,790	0,025	0,002	0,011	
75	1	0,036	/	0,052	0,089	3,151	0,036	/	0,007	0,648	/	/	/	/	/	-2,127	0,052	0,007	/	0,024	2,745	0,089	0,648	/	0,024	
77	1	0,798	0,026	0,218	0,252	1,039	0,798	0,014	0,016	0,098	-4,262	0,026	0,014	0,021	0,033	-1,369	0,218	0,016	0,021	0,819	-1,403	0,252	0,098	0,033	0,819	
78	1	0,077	0,024	0,010	0,037	1,633	0,077	0,018	0,023	0,194	-7,659	0,024	0,018	0,036	0,019	-1,503	0,010	0,023	0,036	0,000	1,243	0,037	0,194	0,019	0,000	
80	1	0,774	0,028	0,478	0,886	1,052	0,774	0,004	0,176	0,541	-3,679	0,028	0,004	0,002	0,002	1,173	0,478	0,176	0,002	0,025	1,013	0,886	0,541	0,002	0,025	
84	1	0,629	0,035	0,142	0,452	-1,101	0,629	0,013	0,016	0,275	-2,606	0,035	0,013	0,032	0,018	-1,461	0,142	0,016	0,032	0,053	-1,168	0,452	0,275	0,018	0,053	
86	1	0,178	0,035	0,087	0,419	1,262	0,178	0,016	0,010	0,017	-2,470	0,035	0,016	0,064	0,029	-1,447	0,087	0,010	0,064	0,027	-1,121	0,419	0,017	0,029	0,027	
87	1	0,015	0,005	0,002	0,015	1,156	0,015	0,004	0,003	0,008	-2,984	0,005	0,004	0,009	0,008	-1,301	0,002	0,003	0,009	0,114	-1,210	0,015	0,008	0,008	0,114	
88	1	0,352	0,019	0,079	0,533	1,234	0,352	0,004	0,003	0,042	-4,332	0,019	0,004	0,011	0,007	-1,868	0,079	0,003	0,012	0,019	-1,171	0,533	0,042	0,007	0,019	

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Prikaz ravnih izražanja celokupnih proteinov vzorcev pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* glede na generacijo 1 (referenca) skupaj z rezultati statistične analize sprememb proteoma (Studentov t-test)

Št. 2-D liste	Nor. V.R. ^a	Generacija 1				Generacija 8				Generacija 12				Generacija 14				Generacija 15							
		t vs. 8	t vs. 12	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V .R. ^a	t vs. 1	t vs. 12	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V .R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V .R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 12	t vs. 15	Nor.V .R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 12	t vs. 14
90	1	0,320	0,006	0,000	0,031	1,189	0,320	0,010	0,020	0,037	-4,760	0,006	0,010	0,021	0,063	-2,054	0,000	0,020	0,021	0,542	-2,266	0,031	0,037	0,063	0,542
93	1	0,374	0,027	0,035	0,377	-1,276	0,374	0,009	0,006	0,907	-3,492	0,027	0,009	0,110	0,015	-2,800	0,035	0,006	0,110	0,016	-1,291	0,377	0,907	0,015	0,016
103	1	0,052	0,005	0,497	0,675	1,513	0,052	0,000	0,003	0,081	-4,773	0,005	0,000	0,001	0,011	1,082	0,497	0,003	0,001	0,383	-1,085	0,675	0,081	0,011	0,383
116	1	0,182	0,025	0,362	0,254	1,164	0,182	0,019	0,086	0,100	-3,228	0,025	0,019	0,030	0,043	-1,103	0,362	0,086	0,030	0,522	-1,209	0,254	0,100	0,043	0,522
120	1	0,009	/	0,027	0,022	2,588	0,009	/	0,919	0,005	/	/	/	/	2,571	0,027	0,919	/	0,129	1,839	0,022	0,005	/	0,129	
121	1	0,574	0,002	0,061	0,479	1,028	0,574	0,001	0,005	0,605	-3,365	0,002	0,001	0,001	0,004	-1,177	0,061	0,005	0,001	0,086	1,077	0,479	0,605	0,004	0,086
122	1	0,029	0,023	0,105	0,373	-1,555	0,029	0,006	0,798	0,003	2,184	0,023	0,006	0,016	0,012	-1,491	0,105	0,798	0,016	0,123	-1,096	0,373	0,003	0,012	0,123
126	1	0,940	0,014	0,096	0,007	-1,003	0,940	0,018	0,329	0,062	-2,537	0,014	0,018	0,013	0,010	1,074	0,096	0,329	0,013	0,037	1,240	0,007	0,062	0,010	0,037
129	1	0,012	0,002	0,770	0,118	-1,343	0,012	0,002	0,015	0,031	2,349	0,002	0,002	0,003	0,027	1,009	0,770	0,015	0,003	0,128	1,291	0,118	0,031	0,027	0,128
130	1	0,818	0,257	0,014	0,497	1,031	0,818	0,185	0,005	0,266	1,193	0,257	0,185	0,002	0,070	2,542	0,014	0,005	0,002	0,005	-1,134	0,460	0,266	0,070	0,005
131	1	0,017	0,498	0,005	0,014	2,299	0,017	0,226	0,194	0,205	1,355	0,498	0,226	0,124	0,403	2,951	0,005	0,194	0,124	0,042	1,812	0,014	0,205	0,403	0,042
140	1	0,195	0,002	0,627	0,141	1,119	0,195	0,000	0,166	0,415	-4,238	0,002	0,000	0,001	0,000	1,036	0,627	0,166	0,001	0,107	1,154	0,141	0,415	0,000	0,107
146	1	0,933	0,022	0,918	0,359	1,010	0,933	0,013	0,740	0,195	-6,197	0,022	0,013	0,009	0,015	-1,048	0,918	0,740	0,009	0,111	-1,338	0,359	0,195	0,015	0,111
148	1	0,043	0,006	0,924	0,138	1,430	0,043	0,003	0,036	0,010	-4,563	0,006	0,003	0,006	0,003	1,010	0,924	0,036	0,006	0,124	1,194	0,138	0,010	0,003	0,124
151	1	0,001	0,015	0,007	0,174	1,811	0,001	0,007	0,003	0,005	-3,635	0,015	0,007	0,010	0,014	1,326	0,007	0,003	0,010	0,031	1,085	0,174	0,005	0,014	0,031
152	1	0,225	0,122	0,022	0,372	1,439	0,225	0,067	0,118	0,561	-1,592	0,122	0,067	0,014	0,078	2,314	0,022	0,118	0,014	0,053	1,228	0,372	0,561	0,078	0,053
167	1	0,026	0,729	0,007	0,030	1,992	0,026	0,048	0,166	0,537	-1,055	0,729	0,048	0,023	0,059	2,486	0,007	0,166	0,023	0,083	1,812	0,030	0,537	0,059	0,083
182	1	0,912	0,047	/	0,907	1,009	0,912	0,045	/	0,985	2,385	0,047	0,045	/	0,043	/	/	/	/	1,007	0,907	0,985	0,043	/	
187	1	0,039	0,011	0,217	0,862	-4,141	0,039	0,108	0,094	0,067	-1,848	0,011	0,108	0,368	0,155	-1,414	0,217	0,094	0,368	0,424	-1,019	0,862	0,067	0,155	0,424
201	1	0,352	0,006	0,041	0,141	1,114	0,352	0,007	0,031	0,089	-2,082	0,006	0,007	0,009	0,044	-1,373	0,041	0,031	0,009	0,704	-1,306	0,141	0,089	0,044	0,704
205	1	0,025	0,048	0,031	0,213	-2,307	0,025	0,005	0,234	0,018	1,721	0,048	0,005	0,004	0,008	-1,975	0,031	0,234	0,004	0,018	-1,238	0,213	0,018	0,008	0,018
209	1	0,378	0,040	0,713	0,311	-1,340	0,378	0,021	0,364	0,136	2,491	0,040	0,021	0,167	0,134	1,240	0,713	0,364	0,167	0,652	1,485	0,311	0,136	0,134	0,652
210	1	0,136	0,033	0,084	0,634	1,125	0,136	0,026	0,021	0,380	-2,376	0,033	0,026	0,042	0,101	-1,127	0,084	0,021	0,042	0,991	-1,101	0,634	0,380	0,101	0,991

se nadaljuje

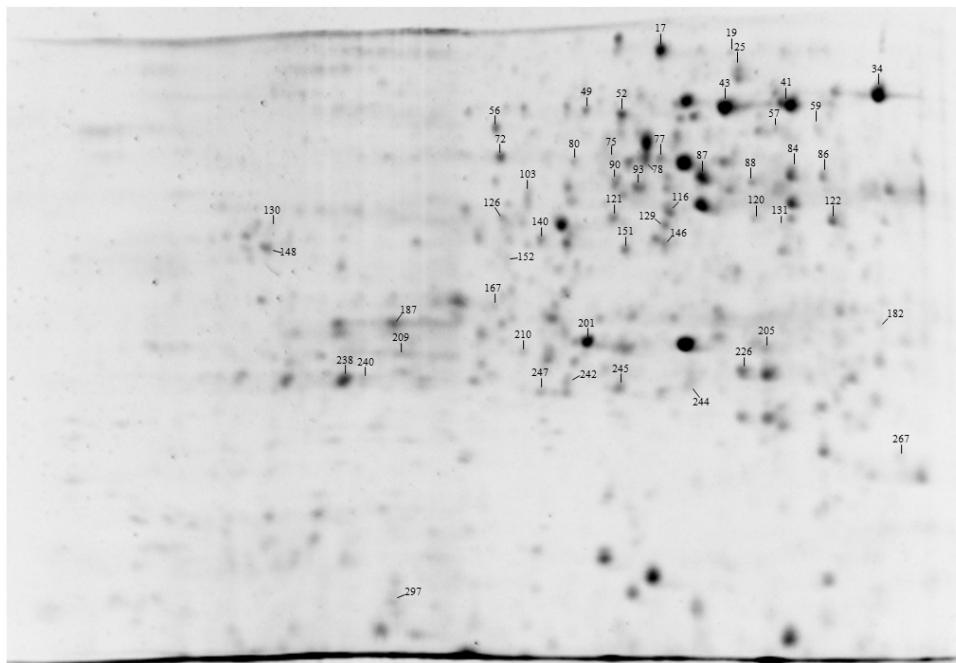
nadaljevanje priloge A: Prikaz ravnih izražanja celokupnih proteinov vzorcev pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* glede na generacijo 1 (referenca) skupaj z rezultati statistične analize sprememb proteoma (Studentov t-test)

Št. 2-D lise	Nor. V.R. ^a	Generacija 1				Generacija 8				Generacija 12				Generacija 14				Generacija 15							
		t vs. 8	t vs. 12	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V.R. ^a	t vs. 1	t vs. 12	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V.R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 14	t vs. 15	Nor.V.R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 12	t vs. 15	Nor.V.R. ^a	t vs. 1	t vs. 8	t vs. 12	t vs. 14
226	1	0,936	0,006	0,322	0,255	1,004	0,936	0,003	0,062	0,054	-2,365	0,006	0,003	0,003	0,003	-1,067	0,322	0,062	0,003	0,256	-1,083	0,255	0,054	0,003	0,256
238	1	0,088	0,500	0,100	0,221	-2,176	0,088	0,081	0,312	0,584	1,037	0,500	0,081	0,086	0,201	-1,506	0,100	0,312	0,086	0,738	-1,652	0,221	0,584	0,201	0,738
240	1	0,021	0,043	0,043	0,190	2,569	0,021	0,011	0,009	0,046	-1,979	0,043	0,011	0,119	0,030	-1,407	0,043	0,009	0,119	0,031	1,275	0,190	0,046	0,030	0,031
242	1	0,105	0,048	0,122	0,414	-1,566	0,105	0,031	0,933	0,960	-2,051	0,048	0,031	0,097	0,523	-1,574	0,122	0,933	0,097	0,948	-1,432	0,414	0,960	0,523	0,948
244	1	0,171	0,001	0,030	0,777	1,147	0,171	0,004	0,418	0,986	2,768	0,001	0,004	0,000	0,190	1,212	0,030	0,418	0,000	0,925	1,273	0,777	0,986	0,190	0,925
245	1	0,027	0,004	0,023	0,546	-1,387	0,027	0,003	0,144	0,063	2,483	0,004	0,003	0,002	0,016	-1,244	0,023	0,144	0,002	0,094	1,080	0,546	0,063	0,016	0,094
247	1	0,784	0,004	0,096	0,173	-1,035	0,784	0,012	0,282	0,215	3,251	0,004	0,012	0,004	0,019	-1,279	0,096	0,282	0,004	0,061	1,306	0,173	0,215	0,019	0,061
267	1	/	0,012	/	/	/	/	/	/	/	4,369	0,012	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
297	1	/	0,012	/	/	/	/	/	/	/	4,649	0,012	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

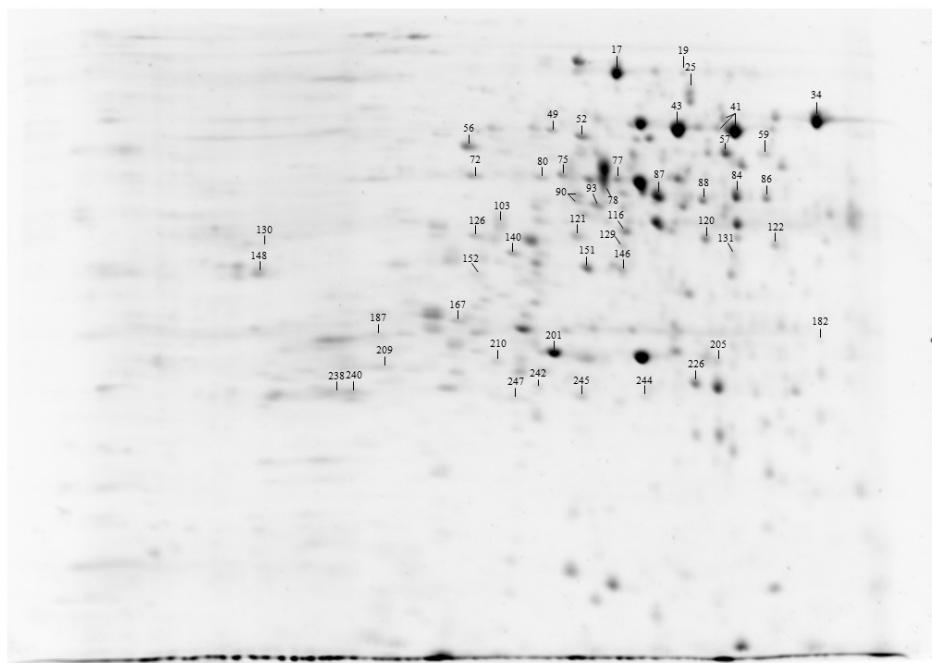
^a Nor.V.R. - razmerje normaliziranih vrednosti glede na referenčni gel (generacija 1) – proteini so bolj (volumen 2-D lis se poveča – pozitivna vrednost) ali manj (volumen 2-D lis se zmanjša – negativna vrednost) izraženi kot pri referenci
obarvane celice – proteini so diferencialno izraženi – razmerje med V_N posamezne 2-D lise tretiranega vzorca in V_N kontrole oz. reference je večje (zeleno obarvane celice) ali manjše (rumeno obarvane celice) od 2

t vs. ... – statistična analiza spremembe proteoma (Studentov t-test) glede na naveden gel

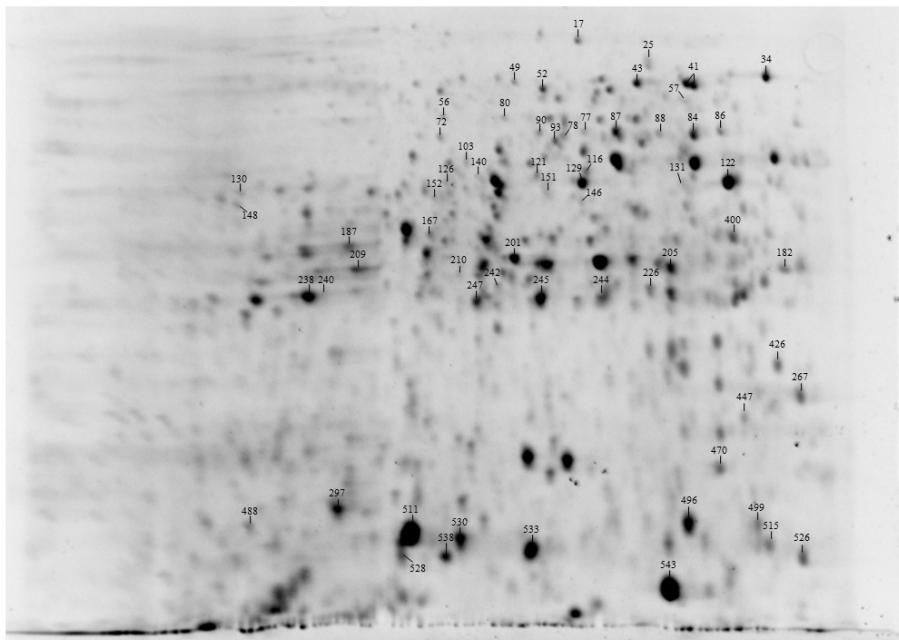
/ - omenjen protein oz. 2-D lisa se na navedenem gelu ne pojavi



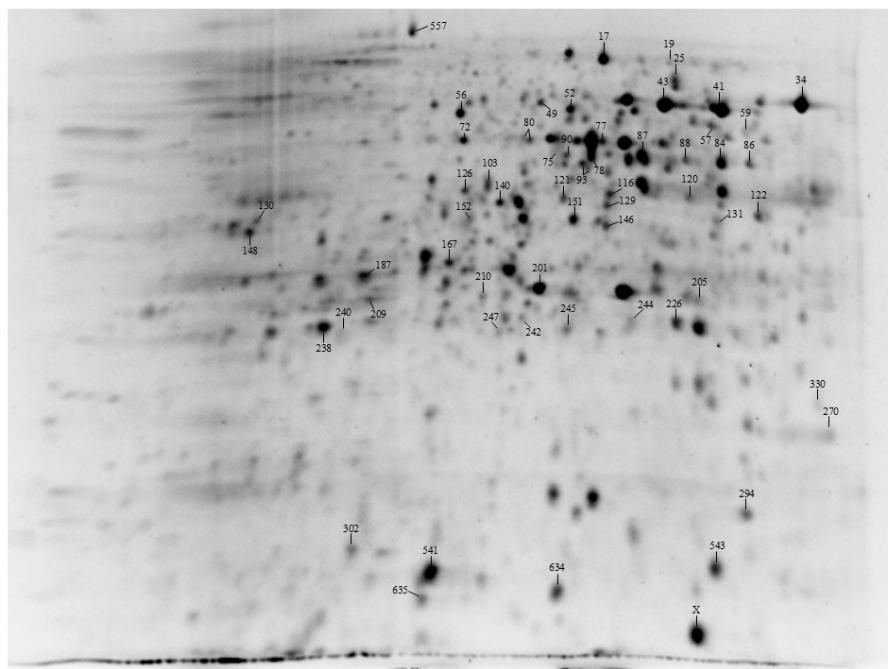
Priloga B: Proteinski profil celičnega ekstrakta pive kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 1 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov



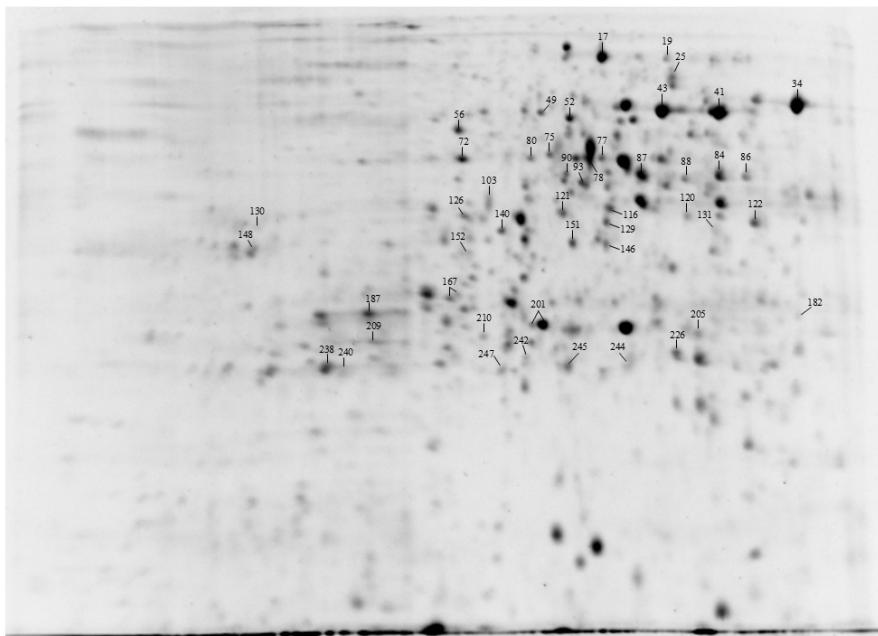
Priloga C: Proteinski profil celičnega ekstrakta pive kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 8 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov



Priloga D: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 12 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov



Priloga E: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 14 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov



Priloga F: Proteinski profil celičnega ekstrakta pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* generacije 15 z označenimi 2-D lisami diferencialno izraženih proteinov

Priloga G: Prikaz identificiranih totalnih proteinov vzorcev pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* glede na glavno pot, v kateri so udeleženi in njihove ostale vloge

Št. 2-D liste	Ime proteina ^a	Glavna pot v kateri je udeležen ^b	Vloga proteina ^c	Ostale vloge ^d
17	IpdC	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	
25	Pdc1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	
34	Eno1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
41	Eno2	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
43	Eno2	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
49	Eno2	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
52	Eno2	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
56	Act1	gradnik citoskeleta	transport in katabolizem	
72	Adh4 ^e	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	metabolizem lipidov; metabolizem AK
77	Adh4 ^e	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	metabolizem lipidov; metabolizem AK
78	Fba1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; pentoza fosfatna pot, metabolizem fruktoze in manoze; metabolizem metana

se nadaljuje

nadaljevanje priloge G: Prikaz identificiranih totalnih proteinov vzorcev pivske kvasovke *Saccharomyces pastorianus* glede na glavno pot, v kateri so udeleženi in njihove ostale vloge

Št. 2-D lise	Ime proteina ^a	Glavna pot v kateri je udeležen ^b	Vloga proteina ^c	Ostale vloge ^d
84	Eno2/Eno1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
86	Pgk1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK
87	Eno2	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
88	Pgk1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK
93	Eno2	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
116	Eno2	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
121	Eno2	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
122	Eno1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
126	Adh4	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	metabolizem lipidov; metabolizem AK
129	Eno1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
140	Gpp1 ^e	metabolizem glicerolipidov	metabolizem lipidov	
148	Rps0A	nahaja se v ribosomu	translacija	
151	Asc1	biogeneza mRNA		
167	HSP26-like protein	obdelava proteinov v ER	zlaganje, razvrščanje, razgradnja	
187	Adh4	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	metabolizem lipidov; metabolizem AK
201	Tpi1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem fruktoze in manoze, metabolizem inozitol fosfata
205	Eno1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
226	Tdh3 ^e	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK
238	Adh4	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	metabolizem lipidov; metabolizem AK
245	veriga A Gpm1	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; metabolizem glicina, serina, treonina
247	Eno1p	glikoliza/glukoneogeneza	metabolizem OH	C metabolizem, biosinteza AK; metabolizem metana; razgradnja RNA
557	YNL209Wp -like protein	nastanek spajalnega telesca	transkripcija	obdelava proteinov v ER; endocitoza

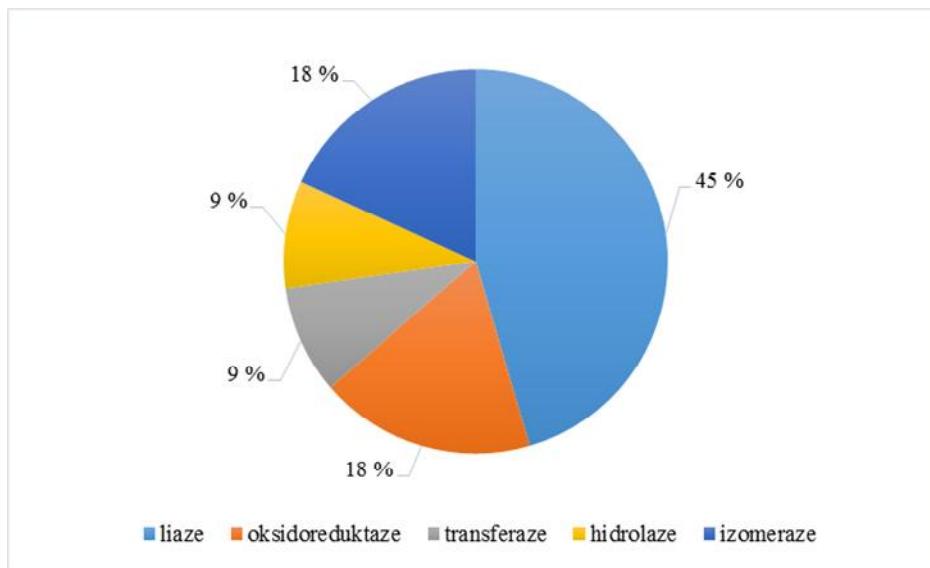
^a identifikacija 2-D lis na podlagi masne spektrometrije (Univerza York)

^b glavna pot v kateri je udeležen protein glede na razvrstitev v podatkovni bazi KEGG

^c vloga proteina glede na razvrstitev v podatkovni bazi KEGG

^d ostale vloge proteina glede na razvrstitev v podatkovni bazi KEGG

^e najverjetnejša identiteta proteina



Priloga H: Grafični prikaz sistematske klasifikacije identificiranih proteinov glede na encimski razred, če encime z večimi izoblikami upoštevamo le enkrat

Priloga I: Prikaz normaliziranih volumnov Enol po generacijah

Št. 2-D lise	Generacija 1	Generacija 8	Generacija 12	Generacija 14	Generacija 15
34	1,60783	2,7253	0,3099305	1,433905	2,562
84	0,9945	0,9025025	0,381563	0,680539	0,85099
122	0,5693365	0,365814	1,24353	0,381665	0,5191115
129	0,2694435	0,200512	0,63282	0,2718005	0,3476695
205	0,323483	0,140106	0,5565915	0,163691	0,2611465
247	0,150104	0,1448655	0,4878535	0,1173495	0,196007
SKUPAJ	3,914697	4,4791	3,612289	3,04895	4,736925
Glede na 1	1	1,144175	-1,08372	-1,28395	1,210036

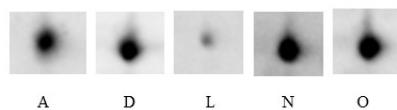
Priloga J: Prikaz normaliziranih volumnov Eno2 po generacijah

Št. 2-D lise	Generacija 1	Generacija 8	Generacija 12	Generacija 14	Generacija 15
41	2,43026	3,038445	0,583264	1,766885	2,263905
43	2,05647	2,84456	0,2623235	1,35989	2,113785
49	0,263334	0,230276	0,0633703	0,138398	0,206254
52	0,63082	0,4791445	0,1697945	0,3871615	0,4295635
84	0,9945	0,9025025	0,381563	0,680539	0,85099
87	1,24518	1,438825	0,417237	0,956543	1,028365
93	0,7258495	0,5686225	0,207788	0,2591085	0,562075
116	0,5336615	0,6206815	0,165309	0,48366	0,4412715
121	0,3639545	0,37382	0,108143	0,309248	0,391798
SKUPAJ	9,2440295	10,496877	2,3587923	6,341433	8,288007
Glede na 1	1	1,1355305	-3,918967	-1,457719	-1,11535

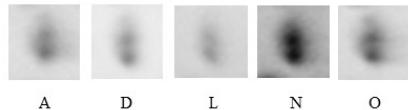
Priloga K: Prikaz normaliziranih volumnov Adh4 po generacijah

Št. 2-D lise	Generacija 1	Generacija 8	Generacija 12	Generacija 14	Generacija 15
72	0,524313	0,368238	0,067036	0,369735	0,545436
77	0,2864145	0,2974485	0,0671913	0,209115	0,204122
126	0,2584985	0,257662	0,1018685	0,2774895	0,320361
187	0,882226	0,212867	0,477392	0,6237065	0,8658985
238	1,031369	0,473779	1,0693	0,6846495	0,6240115
SKUPAJ	2,982821	1,6099945	1,7827877	2,1646955	2,559829
Glede na 1	1	-1,85269	-1,673122	-1,37794	-1,165242

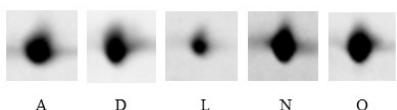
Priloga L: Prikaz sprememb identificiranih 2-D lis po generacijah



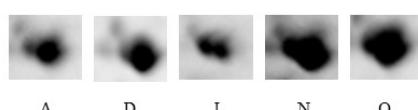
Št. 2-D lise: 17



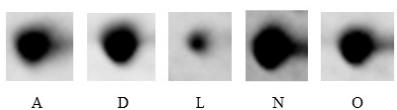
Št. 2-D lise: 25



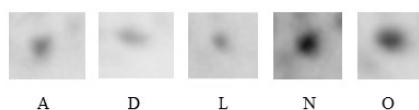
Št. 2-D lise: 34



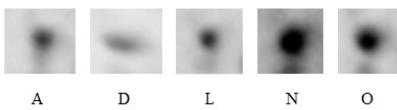
Št. 2-D lise: 41



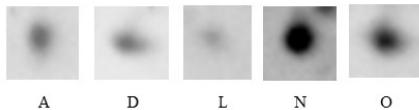
Št. 2-D lise: 43



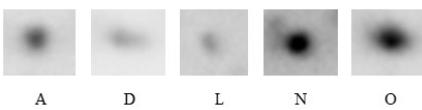
Št. 2-D lise: 49



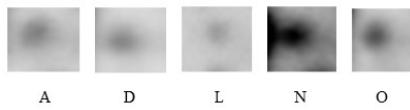
Št. 2-D lise: 52



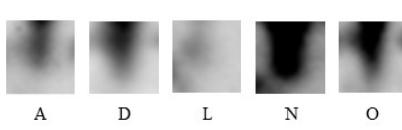
Št. 2-D lise: 56



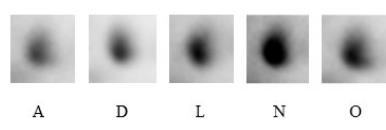
Št. 2-D lise: 72



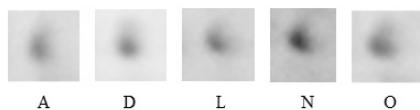
Št. 2-D lise: 77



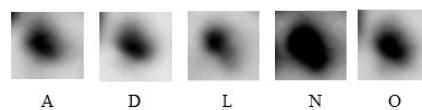
Št. 2-D lise: 78



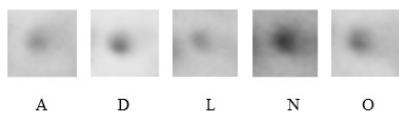
Št. 2-D lise: 84



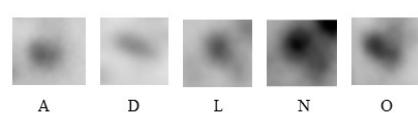
Št. 2-D lise: 86



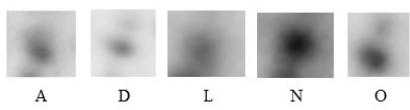
Št. 2-D lise: 87



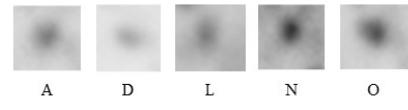
Št. 2-D lise: 88



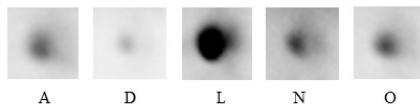
Št. 2-D lise: 93



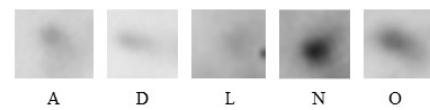
Št. 2-D lise: 116



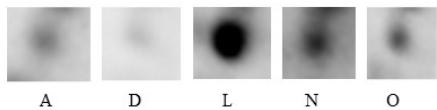
Št. 2-D lise: 121



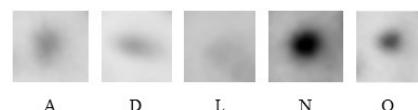
Št. 2-D lise: 122



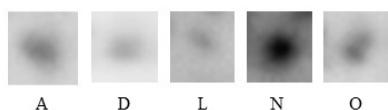
Št. 2-D lise: 126



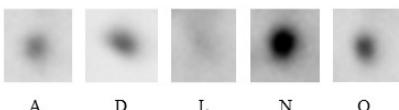
Št. 2-D lise: 129



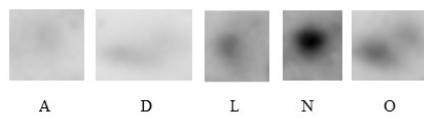
Št. 2-D lise: 140



Št. 2-D lise: 148

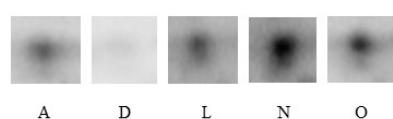


Št. 2-D lise: 151



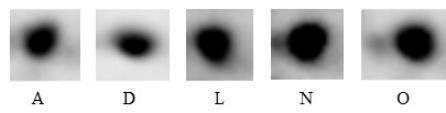
A D L N O

Št. 2-D lise: 167



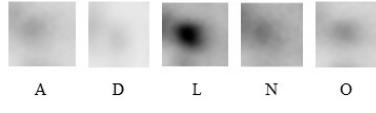
A D L N O

Št. 2-D lise: 187



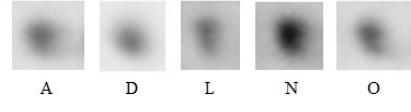
A D L N O

Št. 2-D lise: 201



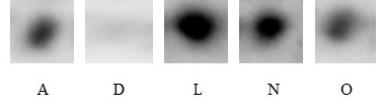
A D L N O

Št. 2-D lise: 205



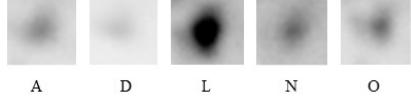
A D L N O

Št. 2-D lise: 226



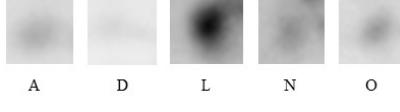
A D L N O

Št. 2-D lise: 238



A D L N O

Št. 2-D lise: 245



A D L N O

Št. 2-D lise: 247