

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Aleš OGRINEC

**ANALIZA PRIMERNOSTI METOD DOLOČANJA
ŽIVOSTI KVASOVK MED ZAPOREDNIMI
FERMENTACIJAMI PIVA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Aleš OGRINEC

**ANALIZA PRIMERNOSTI METOD DOLOČANJA ŽIVOSTI
KVASOVK MED ZAPOREDNIMI FERMENTACIJAMI PIVA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

**THE ADEQUACY OF THE METHODS FOR DETERMINING YEAST
VIABILITY BETWEEN SUCCESSIVE BEER FERMENTATIONS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v genskem laboratoriju Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Sonjo Smole Možina, za somentorja dr. Jureta Zupana in za recenzentko prof. dr. Tatjano Košmerl.

Mentorica: prof. dr. Sonja Smole Možina

Somentor: dr. Jure Zupan

Recenzentka: prof. dr. Tatjana Košmerl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Aleš Ogrinec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 663.123:582.282.23:577.12(043)=163.6
KG	kvasovke/pivske kvasovke/ <i>Saccharomyces pastorianus</i> /pivo/fermentacija piva/inokulacija/reinokulacija/živost/vitalnost/kultivabilnost/flokulacija
AV	OGRINEC, Aleš, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica)/ZUPAN, Jure (somentor)/ KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	ANALIZA PRIMERNOSTI METOD DOLOČANJA ŽIVOSTI KVASOVK MED ZAPOREDNIMI FERMENTACIJAMI PIVA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana)
OP	X, 63 str., 4 pregл., 12 sl., 24 pril., 122 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Cilj magistrske naloge je bil proučiti 31 zaporednih ponovnih inokulacij na laboratorijskem nivoju pri fermentaciji lager piva. Skozi ponovne inokulacije smo določali različne fiziološke parametre kvasnim celicam s petimi različnimi metodami, ki se za ta namen uporabljajo v pivovarstvu. Metode niso nadomestljive in ne določajo istih lastnosti celice. S prvo metodo smo določili kultivabilnost na trdnem gojišču (CFU). Z drugo metodo smo merili integriteto celične membrane (komercialni set »LIVE/DEAD« (Invitrogen)) in določali vitalnost celic. S tretjo metodo smo spektrofotometrično merili optično gostoto (OD) fermentacijske brozge. Kot četrto metodo smo uporabili barvanje z metilenškim modrilom in štetje celic pod mikroskopom za določanje živosti. S peto metodo smo določili stopnjo flokulacije na koncu fermentacije. Rezultate metod smo ovrednotili s statistično analizo in analizirali primernost metod za uporabo v pivovarstvu. Primerjava statističnih analiz metod je pokazala, da so statistično značilne razlike med ponovnimi inokulacijami pri vseh metodah. Najmanj statistično značilnih razlik med ponovnimi inokulacijami glede na izbrane točke se je pokazalo pri metodi barvanja z metilenškim modrilom in štetjem pod mikroskopom. Metodo določanja OD priporočamo kot najbolj robustno in enostavno za rutinsko spremeljanje fermentacij ob ustrezni implementaciji in dobim sistemu za štetje pod mikroskopom. Najbolj zanesljive rezultate pa dobimo, če parametre živosti in vitalnosti preverimo z več različnimi metodami, saj tako dobimo najbolj objektivno sliko.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDK 663.123:582.282.23:577.12(043)=163.6
CX yeasts/brewing yeasts/*Saccharomyces pastorianus*/beer/beer
fermentation/pitching/repitching/viability/vitality/cultivability/flocculation
AU OGRINEC, Aleš
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor)/ZUPAN, Jure (co-advisor)/KOŠMERL,
Tatjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2016
TY ANALYSIS OF METHODS FOR DETERMINING THE YEAST VIABILITY
BETWEEN SUCCESSIVE BEER FERMENTATION
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
NO X, 63 p., 4 tab., 12 fig., 24 ann., 122 ref.
LA sl
AI sl/en
AB In this study we investigated 31 successive runs of laboratory scale lager beer fermentation. Through serial repitching various physiological parameters of yeasts using five different methods that are used for this purpose in the brewing industry were determined. The methods do not determine the same cell properties, therefore they are not interchangeable. The first method determined cultivability on a solid medium (CFU), the second method measured integrity of the cell membrane (commercial kit "Live/Dead" (Invitrogen)) and determined cell vitality, the third method spectrophotometrically measured optical density (OD) of the fermentation broth; the fourth method was based on methylene blue staining and counting cells under a microscope to determine cell viability, and finally, the fifth method determined the level of flocculation at the end of fermentation. The results of the methods were evaluated by statistical analysis to determine the suitability of methods for use in brewing industry. Statistical analysis between repitching showed significant differences for all methods. The least statistically significant differences were observed in the method based on methylene blue staining and counting cells under the microscope. The method for determining OD is recommended as the most robust and easy for routine monitoring fermentations with appropriate implementation and suitable system for counting under a microscope. The most reliable results are obtained when the viability and vitality parameters verified by several methods, to give us the most objective picture.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ZGODOVINA PIVOVARSTVA	3
2.2 TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV KVASOVKE <i>S. PASTORIANUS</i>	3
2.3 SESTAVA PIVINE	4
2.4 ZAPOREDNA UPORABA KVASNE BIOMASE	4
2.5 GLAVNI STRESNI DEJAVNIKI MED VARJENJEM PIVA	5
2.5.1 Oksidativni stres	6
2.5.2 Osmotski stres	7
2.5.3 Nižanje pH.....	8
2.5.4 Anaerobni prehod.....	9
2.5.5 Toksičnost etanola	10
2.5.6 Stres zaradi pomanjkanja hrani	11
2.5.6.1 Privzem in omejitve vira ogljika	11
2.5.6.2 Privzem in omejitve vira dušika	11
2.5.7 Hladni šok.....	12
2.6 METODE DOLOČANJA ŽIVOSTI IN VITALNOSTI.....	13
2.6.1 Metode določanja živosti.....	13
2.6.2 Metoda določanja kultivabilnosti CFU	15
2.6.3 Določanje živosti z uporabo metilenskega modrila, slikanjem pod mikroskopom in štetjem z računalniškim programom.....	15
2.6.4 Določanje števila kvasnih celic s pomočjo optične gostote.....	16
2.6.5 Metode določanja vitalnosti.....	16
2.6.6 Metoda določanja kinetike kvasovk z barvilom FUN1	17
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 MATERIALI	19
3.1.1 Delovni organizem	19
3.1.2 Trdno YPD gojišče	19
3.1.3 Tekoče YPD gojišče	19
3.1.4 Pivina	19
3.1.5 Fosfatni pufer z metilenskim modrilm	19

3.1.6	Določanje živosti kvasovk s setom Live/Dead (Thermo Fisher Scientific)	20
3.1.6.1	Pufer GH.....	20
3.1.6.2	Barvilo FUN1	20
3.1.7	Mikrofermentacijski sistem.....	20
3.2	METODE	23
3.2.1	Priprava biomase za prvo fermentacijo	23
3.2.2	Potek zaporednih fermentacij	23
3.2.3	Zaustavitev fermentacije in pobiranje biomase.....	24
3.2.4	Ponovna inokulacija	24
3.2.5	Določanja stopnje flokulacije z uporabo modificiranega Helm testa	24
3.2.6	Določanja kultivabilnosti na trdnem gojišču (določanje CFU).....	25
3.2.7	Določanje živosti z metodo ImageJ	25
3.2.8	Live/Dead set.....	27
3.2.9	Določanje optične gostote (OD).....	29
3.3	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV IZBRANIH METOD	29
3.3.1	Analiza normalne porazdelitve s testom Sapiro-Wilk	30
3.3.2	Analiza homogenosti varianc s testom Levene	30
3.3.3	Analiza podatkov s testom enofaktorske ANOVA	31
3.3.4	Analiza podatkov z neparametričnim testom Kruskal-Walis	32
3.3.5	Analiza podatkov s testom Mann-Whitney	32
3.3.5.1	Korelacija Bonferroni	33
4	REZULTATI	34
4.1	OPTIMIZACIJA METODE DOLOČANJA VITALNOSTI Z UPORABO BARVILA FUN1 (KOMERCIALNI SET LIVE/DEAD, INVITROGEN)	34
4.2	DOLOČANJE KARAKTERISTIK PIVA PO PRIMARNI FERMENTACIJI ..	37
4.3	SPREMLJANJE PARAMETROV ŽIVOSTI IN VITALNOSTI	39
4.4	SPREMLJANJE PARAMETROV KULTIVABILNOSTI, ŽIVOSTI IN OPTIČNE GOSTOTE	40
4.5	PRIMERJAVA METOD DOLOČANJA ŽIVOSTI IN VITALNOSTI	42
4.5.1	Statistična primerjava metod določanja na prvi točki.....	42
4.5.2	Statistična primerjava metod določanja na drugi točki	44
4.5.3	Statistična primerjava metod določanja na tretji točki	45
5	RAZPRAVA	47
5.1	DOLOČANJE FLOKULACIJE	48
5.2	DOLOČANJE KULTIVABILNOSTI	48
5.3	DOLOČANJE VITALNOSTI	49
5.4	DOLOČANJE ŽIVOSTI Z METILENSKIM MODRILOM	50
5.5	DOLOČANJE ŽIVOSTI Z MERJENJEM OPTIČNE GOSTOTE	50
5.6	PRIMERJAVA METOD	50
6	SKLEPI	52
7	POVZETEK	53
8	VIRI	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Priprava GH pufra	20
Preglednica 2: Sestavni deli mikrofermentacijskega sistema	22
Preglednica 3: Priprava Helm B raztopine	24
Preglednica 4: Priprava različnih koncentracij in deležev vitalnih kvasnih celic za izdelavo umeritvene krivulje.	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz stresnih dejavnikov, ki se pojavljajo pri kvasovkah med namnoževanjem, fermentacijo in shranjevanjem biomase (Gibson in sod., 2007) ..	7
Slika 2: Metode, ki se uporabljajo za določanje živosti kvasnih celic (Kwolek-Mirek in Zadrag-Tecza, 2014)	15
Slika 3: Metode, ki se uporabljajo za določanje vitalnosti kvasnih celic (Kwolek-Mirek in Zadrag-Tecza, 2014)	17
Slika 4: Glavne komponente mikrofermentacijskega sistema, a- jeklenka, b-redukcirni ventil, c- stresalnik Inforce, d- elektromagnetni ventil, e- digitalni merilnik tlaka, f- razdelilna letev, g- fermentor, h- elektromagnetno mešalo	22
Slika 5: Način za slikanje živih celic za kasnejše štetje s programom ImageJ	26
Slika 6: Način slikanja mrtvih celic za kasnejše štetje s programom ImageJ	26
Slika 7: Določanje optimalne koncentracije barvila FUN-1	35
Slika 8: Določanje optimalne koncentracije celic/ml	36
Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje deleža vitalnosti celic z Live/Dead setom	37
Slika 10: Spremljanje stopnje flokulacije, pH ter relativne gostote pivine po 31 zaporednih primarnih fermentacijah piva. Z rdečo zvezdo so označene zaporedne meritve, ki so statistično značilno različne ($p \geq 0,05$) v posamezni točki statistične obdelave	38
Slika 11: Spremljanje vitalnosti in viabilnosti skozi 31 zaporednih primarnih fermentacij. Z rdečo zvezdo so označene zaporedne meritve, ki so statistično značilno različne v posamezni točki statistične obdelave	40
Slika 12: Spremljanje kultivabilnosti kvasovk, optične gostote in živosti kvasovk skozi 31 zaporednih primarnih fermentacij. Z rdečo zvezdo so označene zaporedne meritve, ki so statistično značilno različne v posamezni točki statistične obdelave	41

KAZALO PRILOG

Priloga A: Analiza normalne porazdelitve s Shapiro-Wilk testom na točki 1

Priloga B: Analiza homogenosti varianc z Levene testom točka 1

Priloga C: Analiza s parametričnim testom ANOVA s Tukey post-testom točka 1

Priloga Č: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis na točki 1

Priloga D: Analiza normalne porazdelitve s Shapiro-Wilk testom na točki 2

Priloga E: Analiza homogenosti varianc z Levene testom na točki 2

Priloga F: Analiza s parametričnim testom ANOVA s Tukey post-testom na točki 2

Priloga G: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis na točki 2

Priloga H: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami s post-testom MannWhitney in Bonferronijevo korelacijo.

Priloga I: Analiza normalne porazdelitve s Shapiro-Wilk testom na točki 3

Priloga J: Analiza homogenosti varianc z Levene testom točki 3

Priloga K: Analiza s parametričnim testom ANOVA s Tukey post-testom na točki 3

Priloga L: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis na točki 3

Priloga M: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami s post-testom MannWhitney in Bonferronijevo korelacijo

Priloga N: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 6F

Priloga O: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 7G

Priloga P: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 8H

Priloga R: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 18S

Priloga S: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 19T

Priloga Š: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 20U

Priloga T: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 26AA

Priloga U: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 27AB

Priloga V: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 28AC

Priloga Z: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 29AD

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACB1	Acil-CoA-vezavni protein
AHP1	alkil hidroperoksid reduktaza (ang. Alkyl HydroPeroxide reductase)
Amfiploid	medvrstni hibrid, ki ima vsaj en celoten diploidni set kromosomov od vsake izvorne vrste
ATPaza	adenozin trifosfataza, fosfohidrolaza
CFU	metoda štetja kolonij na trdem gojišču
CVIS	cilindrične intravakuolne strukture
<i>De novo</i>	sinteza kompleksnih molekul iz enostavnih, kot so aminokisline in sladkorji
DNA-DNA	interakcija dveh deoksiribonukleinskih kislin
EDTA	etylendiaminetetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
FSC	direktni kot razpršene svetlobe
FLO1	protein, podoben lektinu, vključen v flokulacijo celic
Fps1	akovagliceroporinski kanalček v plazmalemi
FUN-1	barvilo [2-kloro-4-(2,3-dihidro-3-metil(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden)-1-fenilkinolinijev jodid]
GER2	hidrofinil, pomemben pri rehidraciji oz. sušenju
GLR1	citosomalna in mitohondrijska glutation oksidoreduktaza
GRS	mitohondrijska glicil tRNA sintaza
H ⁺	vodikov proton
HOG	signalni sistem imenovan (ang. High Osmolarity Glycerol)
Hog1	mitogeno aktiviran protein kinaza, vključena v osmoregulacijo
HXK1	heksokinaza izoencim 1
MAL	multigenSKI kompleks, polimerni lokus za fermentacijo maltoze
MAL4	multigenSKI kompleks, polimerni lokus za fermentacijo maltoze
MAP kinaza	mitogeno aktiviran protein kinaza
MET2	gen, ki kodira L-homoserin-O-acetyltransferazo
OD	optična gostota
polimorfizem	prisotnost dveh ali več različnih alelov enega gena v populaciji
Ptp1p	specifična proteinska fosfotirozin fosfataza v mitohondriju in citoplazmi
Ptp2	jedrno specifična fosfotirozin fosfataza, vključena v osmoregulacijo
Ptp3	specifična fosfotirozin fosfataza, vključena v inaktivacijo MAP kinaze
RNA	ribonukleinska kislina
SFA1	bifunkcionalna alkohol dehidrogenaza in formaldehid dehidrogenaza
Skop1p	represor, ki nadzira HOG signalni sistem
Sln1	transmembranska histidin fosfotransferkinaza in osmosensor
SSC	stranski kot razpršene svetlobe
Tukey HDS	Tukey »honest significant difference« test
YEFD	gojišče s kvasnim izvlečkom, peptonom in glukozo

YML131w protein z neznano funkcijo, izrazi se v primeru osmotskega šoka
YPD gojišče (po sestavi enako kot YEPD)
^oP stopinje platojev je enota za merjenje količine sladkorja v pivini

1 UVOD

V današnjem času industrijski trend proizvodnje stremi k čim večji proizvodnji in čim manjšim proizvodnim stroškom, ob pogoju zagotavljanja določene konstantne kakovosti produkta (Kobayashi in sod., 2007).

S takšnimi izzivi se srečujejo tudi podjetja v pivovarski dejavnosti, kjer je eden od večjih stroškov vezan na kvasno biomaso in procese, povezane z njo, kot so: nakup substrata, priprava bioreaktorja, namnoževanje inokuluma, njegovo shranjevanje do inokulacije ter odstranjevanje in ekološko uničenje biomase po fermentaciji. Vsak od procesov, povezanih s kvasno biomaso, predstavlja znatno povečanje proizvodnih stroškov in posledično zmanjšanje dobička podjetja (Bühligen in sod., 2014).

Glavni cilj ponovne uporabe kvasne biomase je znižati stroške pri proizvodnji piva. Pri tem je pomembno, da kakovost proizvoda ostane enaka in čas fermentacije nespremenjen. Pivovarne se zaradi zgoraj omenjenega problema poslužujejo večkratne zaporedne uporabe kvasne biomase, da se izognejo v prejšnjem odstavku omenjenim procesom pri proizvodnji piva. Poleg tega se kvasovke po prvem reciklu adaptirajo na procesne razmere in fermentacija v nadaljnjih ciklih poteka bolj učinkovito (Powell in Diacetis, 2007).

V tuji strokovni literaturi za ta proces najdemo izraz »repitching«, v slovenščini izraz prevedemo kot ponovna inokulacija oz. reinokulacija. Razlog za omejeno ponovno uporabo kvasne biomase je vpliv staranja kvasne biomase na kakovost piva. Med industrijskim procesom se na kvasnih celicah dogajajo stalne spremembe zaradi stresnih dejavnikov, kot so omejitev hranil, spremembe temperature in pH, visok hidrostatski tlak, naraščajoče koncentracije etanola in osmotskega tlaka. Posledice stresa vplivajo na živost celic, fiziologijo, morfologijo in izražanje genov. Posledice osmotskega šoka se kažejo predvsem v slabšem privzemuh sladkorjev, etanol deluje toksično in zavira celično rast, s čimer posledično vpliva na velikost celic in živost. Zaradi stresnih dejavnikov, kot so osmotski šok, oksidativni stres, anaerobni prehod, pomanjkanje hranil, toksičnost etanola in hladni šok, lahko pride do izgube flokulacije in zmanjšanja hitrosti fermentacije (Gasch, 2003).

Pivovarne danes kvasno biomaso ob doslednem pobiranju, shranjevanju in ponovni inokulaciji lahko uporabijo od sedem do dvanajstkrat zaporedoma. Ali je kvasna biomasa primerna za ponovno uporabo, je odvisno od nekaterih dejavnikov: ustreznega aseptičnega dela, živosti oziroma viabilnosti, ter kondicije oziroma vitalnosti kvasovk. Prvi dejavnik je pomemben za preprečevanje okužbe inokuluma. Živost oz. viabilnost nam pove, kolikšen delež celic je živih. Kondicija oz. vitalnost kvasovk nam kaže hitrost metabolizma kvasovk in pretvorbo sladkorja v alkohol (Smart in Whisker, 1996).

Za spremljanje živosti, kondicije in števila celic smo uporabili naslednje metode: metodo določanja kultivabilnosti na trdnem gojišču (določanje CFU); merjenje integritete celične stene (komercialni kit »LIVE/DEAD« (Invitrogen)); določanje optične gostote; določanje živosti z barvanjem z metilenskim modrilmom in štetjem pod mikroskopom. Metode niso nadomestljive in ne določajo istih lastnosti celice.

1.1 CILJI RAZISKOVALNE NALOGE

Magistrska naloga je potekala v okviru projekta sodelovanja s pivovarno Laško, kjer smo študirali repitching na nivoju genoma, proteoma, fenoma oz. metaboloma in procesnih parametrov. Cilj magistrskega dela znotraj projekta je bil ugotoviti, katera metoda merjenja živosti celic je najbolj primerna v pivovarstvu. Za ta namen smo skonstruirali sistem, s katerim smo posnemali industrijske razmere, kot je le to mogoče, in sicer: temperaturo fermentacije, čas fermentacije, sestavo plinov nad tekočo fazo v fermentorju (razmerje kisika in ogljikovega dioksida) in hidrostatski tlak, ki nastane zaradi višine industrijskih fermentorjev. Po vsaki končani fermentaciji smo v okviru te magistrske naloge izvedli analize, s katerimi smo spremljali živost (viabilnost) in kondicijo (vitalnost) kvasovk.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- 20 reinokulacij ne vpliva na živost kvasnega inokuluma.
- Tradicionalna metoda določanja živosti kvasovk z metilenskim modrilmom je ustrezna za pivovarstvo.
- Med posameznimi metodami določanja živosti in vitalnosti obstaja korelacija.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA PIVOVARSTVA

Arheološke najdbe pričajo o pridelavi vina in piva 2000 (Madigan in sod., 1997) in celo 6000 (Homan, 2004) ter 7000 (Demain in sod., 1998) let pr. n. št. in verjetno predstavlja najstarejšo obliko biotehnološke dejavnosti v zgodovini človeštva. Ali odkritje prijetne pijače lahko pripišemo naključni kontaminaciji zrn ali radovednosti ljudi, ostaja skrivnost. Antonie van Leeuwenhoek je leta 1680 prvi opisal kvasovko, medtem ko je l. 1837 Charles Cagniard de Latour prvi poročal in Louis Pasteur 20 let kasneje tudi dokazal, da so kvasovke odgovorne za alkoholno fermentacijo (Barnett, 2000). Do konca 19. st. so s pomočjo tehnike redčenja izolirali čiste seve. Emil Hansen je l. 1883 na podlagi morfologije razdelil različne čiste seve, ki so dajali edinstvene in ponovljive industrijske fermentacije (Rank in sod., 1988). Kasneje so jih glede na flokulacijske lastnosti razdelili na dva tipa: kvasovke zgornjega vrenja (ale in weiss kvasovke) in kvasovke spodnjega vretja (lager kvasovke). *Saccharomyces sensu stricto* zajema nekaj zelo pomembnih vrst za živilsko industrijo, med njimi tudi *Saccharomyces pastorianus*, ki je v današnjem času pomembna za fermentacijo v proizvodnji lager piva. Kljub njeni komercialni pomembnosti tej kvasovki še vedno niso dodelili nedvoumne in natančne taksonomske opredelitve (Rainieri in sod., 2006).

2.2 TAKSONOMSKA RAZVRSTITEV KVASOVKE *S. pastorianus*

Sodobno poimenovanje vrste *S. pastorianus* vključuje stara poimenovanja vrst, izoliranih iz piva, kot so *S. carlbergensis* in *S. monacensis* in ostale vrste spodnjega vrenja, ki so jih sprva obravnavali kot ločene vrste. V kasnejši študiji so na podlagi homologije DNA-DNA ugotovili, da je *S. pastorianus* sev CBS 1513 hibrid med vrstama *S. cerevisiae* in takrat še neznano vrsto, ki je bila najbolj sorodna *S. bayanus*, in ima za 1,5-krat večji genom od omenjenih vrst, kar kaže, da je delni amfiploid, ki bi lahko nastal z naravno hibridizacijo med *S. cerevisiae* in sorodno vrsto *S. bayanus* (Vaughan-Martini in Kurtzman, 1985).

Kasnejša raziskava, ki so jo opravili na podlagi nukleotidnega zaporedja genov MET2 in ACB1, je pripeljala do rezultatov in predloga, da je *S. pastorianus* hibrid in da se je dogodek hibridizacije zgodil nedavno (Hansen in Kielland-Brandt, 1994). Večina se je strinjala s predlaganim modelom, da je *S. pastorianus* nastal s hibridizacijo ale seva *S. cerevisiae* in *S. bayanus*, vendar DNA *Saccharomyces pastorianus* ni skupen obema predlaganim staršema (Rainieri in sod., 2006). Sledilo je odkritje *S. eubayanus*, ki je bil prvič opisan kot neodvisna samostojna vrsta leta 2011 v Patagoniji. Primerjava identitete med *S. pastorianus* in *S. eubayanus* je 99,5 % in kaže določene razlike v spremembah metabolizma sladkorjev in sulfatov, kar je bilo ključno za udomačitev lager seva. Verjetno je ravno hibridna narava *S. pastorianus* (*S. cerevisiae* x *S. eubayanus*) odgovorna za uspešnost omenjenega organizma pri fermentacijah piva, zlasti njegova psihrotrofna narava, ki je očitno podedovana od kvasovke vrste *S. eubayanus*, ki so odporne na nizke

temperature in posledično odgovorne za vrhunsko učinkovitost pri nizkih temperaturah fermentacije (Libkind in sod., 2011).

Dogodek hibridizacije, ki je vodil k oblikovanju *S. pastorianus*, se je predvidoma zgodil večkrat v zgodovini, kar je na začetku privelo do visoke stopnje raznolikosti v pivovarski industriji. Raziskovalci, kot sta Louis Pasteur in Emil Hansen, so s svojim delom prišli do spoznanja, da sta uvedbi dobre higiene in uporaba čistih kultur bistvenega pomena za preprečevanje kvarjenja piva (Barnett in Lichtenthaler, 2001). To je privelo do osamitve dveh posameznih sevov, Saaz in Frohberg, ki so ju poimenovali po lokaciji izvora, kjer so bili prvotno uporabljeni, to sta Češka in Nemčija. S časom sta se omenjena seva razširila po drugih evropskih državah, na koncu osvojila cel svet in se danes uporablja v vseh modernih pivovarnah (Gibson in sod., 2013).

2.3 SESTAVA PIVINE

Pivina je kompleksen medij. Večinoma jo sestavljajo ogljikovi hidrati, ki sestavljajo 90 % suhe snovi, od tega dušikove snovi sestavljajo 5 % suhe snovi. Ostalo so snovi, prisotne v manjših količinah, kot so fosfati, anorganske soli, lipidi, organske kisline, polifenoli in derivati nukleinskih kislin (Briggs in sod., 2004). Glavni del ogljikovih hidratov v pivini predstavljajo fermentabilni ogljikovi hidrati: trisaharid maltotriosa, disaharida maltoza in sahroza in monosaharida glukoza in fruktoza. Nefermentabilni del ogljikovih hidratov v večini predstavlja dekstrin, skupaj z nekaterimi saharidi, kot so arabinosa, ksiloza, riboza, isomaltoza, panoza in izopanoza (Bulton in Quain, 2001). Kvasovke običajno prvo privzamejo saharozo, nato sledita glukoza in fruktoza. Maltozo in maltotriozo kvasovke izkoristijo kot zadnja fermentabilna sladkorja in ob koncu fermentacije lahko del teh sladkorjev ostane v pivu (Patel in Ingledew, 1973).

2.4 ZAPOREDNA UPORABA KVASNE BIOMASE

»Serial repitching« je angleški izraz za ponovno uporabo kvasne biomase, katere namen je zmanjšati stroške v proizvodnji piva, zato je postala splošna praksa v pivovarnah. Ob zaključku fermentacije piva se del biomase shrani za kratek čas in se kasneje z njo inokulira novo šaržo sveže pivine. Pri tem je posebna pozornost namenjena učinkovitemu pobiranju in shranjevanju kvasne biomase za kasnejše fermentacije, saj proces vpliva na to, kolikokrat zaporedoma bo lahko biomasa uporabljená (Powell in sod., 2003). Navadno v pivovarnah uporabijo kvasno biomaso v 8 do 15 zaporednih fermentacijah (Boulton, 1991). Želje pivovarjev in stroke so, da bi bilo mogoče kvasno biomaso uporabiti v neomejenem številu zaporednih fermentacij. Vendar je praksa pokazala, da po določenem času nastanejo težave s starostnimi spremembami kvasa, kar neposredno vpliva na zmanjšano sposobnost fermentacije in spremembo senzoričnega profila piva (Gibson in sod., 2008).

Na fermentacijsko sposobnost kvasa med drugim vplivajo zunanji dejavniki, kot so relativna gostota pivine, vsebnost kisika v pivini, število celic na ml pivine in temperatura, poleg tega imajo velik vpliv na fermentacijsko sposobnost tudi hidrostatsični in osmotski tlak, pH, parcialni tlak CO₂, bilanca hranil in stopnja alkohola (Kordalik-Bogacka in Diowksz, 2013). Degeneracija kvasa se kaže predvsem v sposobnosti flokulacije, stopnji rasti in fermentacijski moči (Lense, 1996). Pri zaporednih fermentacijah lahko pride do sprememb v DNA skozi čas (Sato in sod., 2001). Takšne spremembe v genomu populacije morda niso vedno takoj opazne in morda ne vplivajo na kakovost produkta, vendar se skozi daljši čas zaporedne uporabe biomase poveča možnost kopičenja določene populacije s spremembami v genomu. Te populacije lahko tekmujejo z originalno kulturo, jo presežejo in s tem vplivajo na kočni produkt.

Akumulacija variant in možnost izbora celic pri pobiranju lahko povzroči, da se določene značilnosti prenesejo na naslednjo generacijo, kar lahko privede do genetskega zdrsa oz. spremembe frekvence alela v kulturi zaradi naključnega vzorčenja. Za številne komercialne lager seve so značilni polimorfizmi v dolžini kromosomov, predvsem na tistih, ki vsebujejo gene, direktno povezane z uspešnostjo fermentacije, kot so FLO1, HXK1 in MAL4 (Powell in Diacetis, 2007). Nekatere pivovarne se preventivno izogibajo ponovni uporabi kvasne biomase, saj je to dolgotrajen biotehnoški proces in obstaja velika verjetnost okužbe z neželenimi mikroorganizmi (Kordalik-Bogacka in Diowksz, 2013).

Proti koncu fermentacije kvas začne tvoriti velike skupke ali flokule, ki se pri lager sevih začnejo posedati na dno fermentorja. Hitrost posedanja posameznih celic je odvisna od njihove replikativne starosti. Po končanem posedanju se tvorijo cone, v katerih so celice različne starosti. Najprej se posedejo najstarejše celice, ki jih običajno najdemo čisto na dnu fermentorja in niso uporabljene v kasnejših fermentacijah, zato v naslednji fermentaciji ponovno uporabimo samo srednjo frakcijo celic. Zgornjo frakcijo celic predstavljajo mlade celice, ki jih lahko poberemo skupaj s srednjo frakcijo, vendar optimalno biomaso predstavlja srednja frakcija (Powell in Diacetis, 2007).

2.5 GLAVNI STRESNI DEJAVNIKI MED VARJENJEM PIVA

Med varjenjem piva so kvasovke izpostavljene mnogim stresnim dejavnikom, ki potencialno lahko poškodujejo celice in vplivajo na uspešnost fermentacije. Le-ta je odvisna od njihove sposobnosti prilaganja spremembam, zlasti pri zaporednih fermentacijah, ki vključujejo ponovno uporabo kvasne biomase. Sodobne prakse, ki vključujejo uporabo suhega kvassa kot inokuluma in pivine z visoko relativno gostoto, povečujejo še dodatne stresne dejavnike, katerim so izpostavljene kvasovke. Pri tem je bistveno, da se kvasovke učinkovito odzovejo na te razmere, ne le za sam proces

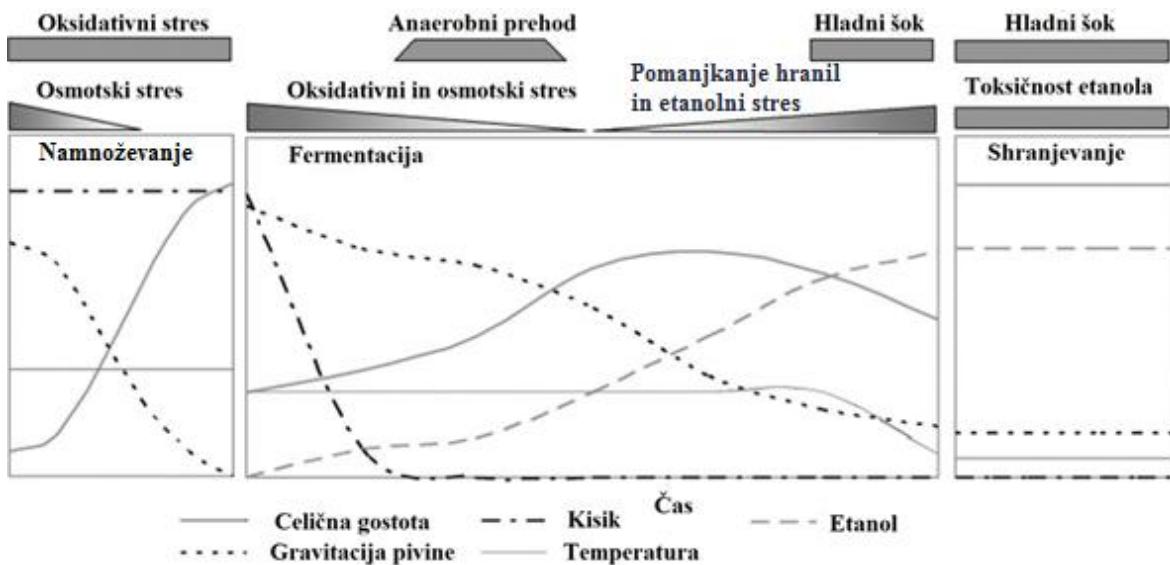
fermentacije piva, temveč tudi za ohranjanje fermentacijske sposobnosti kvasa pri nadalnjih zaporednih fermentacijah (Gibson in sod., 2007).

2.5.1 Oksidativni stres

Veliko vlogo pri staranju in smrti celic imajo prosti radikali, predvsem kisikove reaktivne zvrsti, ki nastajajo med aerobnim dihanjem in povzročajo oksidativne poškodbe celic (Harman, 1956). Oksidativni stres nastane, ko pride do neravnovesja med nastajanjem in odstranjevanjem reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti (Evans in Halliwell, 1999). Celice, ki rastejo v aerobnem okolju, se morajo spopadati s prooksidativnimi razmerami kot so: radikali superoksidnih anionov (O_2^-), vodikovega peroksida (H_2O_2) in hidroksilni ostanki (-OH), ki so običajni stranski produkti pri aerobnem dihanju (Commoner in sod., 1954). Kisikove reaktivne zvrsti izhajajo tudi iz zunanjih okoljskih dejavnikov, kot so redoks aktivne snovi, sevanje in težke kovine (Cabisco in sod., 2000). Posledice, do katerih pride zaradi direktnega ozziroma indirektnega oksidativnega stresa, so peroksidacije lipidov, in posledično celičnih membran, lipoproteinov in drugih lipidnih struktur (Girotti, 1998), inaktivacije proteinov (Cabisco in sod., 2000) in poškodbe nukleinskih kislin (Ribeiro in sod., 2006). Celice imajo encimski in neencimski obrambni sistem za zaščito in vzdrževanje redoks stanja. Neencimski del obrambnega sistema v večini sestavljajo majhne molekule, ki so topne v vodni fazi in lipidnih okoljih, med katere sodijo: glutation, poliamini, askorbinska kislina, vitamin E, trehaloza, metalotioneini, homeostaza kovinskih ionov, flavohemoglobin, tioredoksin in glutaredoksin. Encimski del obrambnega sistema sestavljajo encimi, ki odstranjujejo kisikove radikale in njihove produkte ter popravljajo škodo, ki jo je povzročil oksidativni stres. Mednje sodijo: katalaza, superoksid dismutaza, encimi pentoza fosfatne poti, glutation reduktaza, glutation peroksidaza, metionin reduktaza in endonukleaza Apn1 (Jamieson, 1998).

Kisik ima pomembno vlogo v pivovarskem procesu. Oskrba kvasovk s kisikom je nujna med namnoževanjem kvasne biomase in na začetku fermentacije, da lahko kvasovke dosežejo optimalno koncentracijo za učinkovit proces fermentacije (Hulse, 2010). Kisik je pomemben pri biosintezi lipidov, predvsem nenasičenih maščobnih kislin in sterolov, saj so kvasovke za njih avksotrofne, zato morajo biti te spojine sintetizirane v aerobni fazi fermentacije. Nekatere od njih jih lahko privzamejo direktno iz pivine. Te spojine se vključijo v celične strukture in so vir metabolnih intermediatov v anabolni in katabolni poti. Odgovorne so za vzdrževanje integritete celične membrane in posledično za celično delitev. Kvasovke lahko asimilirajo eksogene sterole le v anaerobnih pogojih, ko je *de novo* sinteza izključena. Ta pojav se imenuje aerobna izključenost sterolov. Vendar lahko zaradi prekomerne izpostavljenosti kisiku na začetku fermentacije pride do prekomerne rasti kvasa na račun nižje produkcije etanola (Briggs, 2004). Torej je za uspešno fermentacijo potrebna optimalna koncentracija kisika. Izpostavljenost kisiku pri ponovnih

inokulacijah povzroča počasno, vendar kontinuirno poslabšanje celičnih komponent, ki jih povzročajo reaktivne kisikove zvrsti (Harman, 1980; Cabiscool in sod., 2000).



Slika 1: Shematski prikaz stresnih dejavnikov, ki se pojavljajo pri kvasovkah med namnoževanjem, fermentacijo in shranjevanjem biomase (Gibson in sod., 2007)

2.5.2 Osmotski stres

Kvasovke se odzovejo na spremembe v okolju tako, da usklajujejo znotrajcelične aktivnosti za potrebe preživetja in rasti. Neravnovesje med znotrajcelično in zunajcelično osmolarnostjo povzroča osmotski stres, zaradi česar pride do škodljivih sprememb v fiziologiji celice (Csonka in Hanson, 1991). Celice, kot tudi mikroorganizmi, so razvili mehanizme za prilaganje na nenehno podvržene zunanjim osmolarnim spremembam (Tamás in Hohmann, 2003). Osmoregulacija zajema aktivne procese, s katerimi celica spremlja in uskljuje osmotski tlak, nadzoruje obliko in turgor (Klipp in sod., 2005).

Izpostavljenost kvasovk nizkemu okoljskemu osmotskemu potencialu privede do vdiranja vode v celico in povzroči hipotonični stres, pri čemer celica inducira specifični odziv, ki se kaže v aktivnosti transporterjev topljenca, spremembami delovanja encimov, vključenih v akumulacijo topljenca in izražanju genov, odgovornih za sintezo topljenca, rezistenco stresa in spremembe v strukturi celične stene (Dihazi in sod., 2001). Pri izpostavljenosti kvasovk okolju, ki vsebuje veliko topljenca, pride do hipertoničnega stresa, pri čemer voda izhaja iz celice. Odziv na stres poteka kot osmoregulacija, ki je homeostatični proces. Osrednjega pomena osmotske prilagoditve kvasovk na homeostazo je signalni sistem HOG (->high osmolarity glycerol<-) (Dihazi in sod., 2004). Kvasovke vrste *S. cerevisiae*

nadzorujejo osmotske spremembe prek osmoreceptorja histidin kinaza Sln1, lokaliziranega v celični membrani. V normalnih razmerah je Sln1 aktiviran in zavira signalizacijo, ob izgubi turgorja se deaktivira (Reiser in sod., 2003). Nato se preko mitogena aktivira protein MAP kinaza Hog1. Aktiviran Hog1 se akumulira v jedru, kjer sproži izražanje dveh tarčnih genov, ki kodirata encime odgovorne za tvorbo glicerola, ki služi kot osmolit za povečanje znotrajceličnega osmotskega tlaka (Hohmann, 2002). Akumulacija glicerola je tudi nadzorovana preko akvaglikoproteina Fps1, ki je osmoregulatorni glicerolni kanalček (Toh in sod., 2001).

Aktivacija Hog1 in od Hog1 odvisnih transkripcijskih stimulatorjev je negativno povratno regulirana s proteinskimi fosfatazami: Ptp2, Ptp3 in Ptp1p, ki so odgovorne za defosforilacijo različnih spojin v metabolni poti (Lam in sod., 2015). Transkripcijski odziv kvasovk na osmotski stres, ki je reguliran v poti HOG preko Sko1p mediatorja, deluje tudi neposredno na pet genov: GRE2, AHP1, SFA1, GLR1, YML131w, ki kodirajo oksidoreduktaze in sodelujejo pri popravilu oksidativnih poškodb (Rep in sod., 2001).

Med fermentacijo piva večji del stresa predstavlja dva glavna vira. Prvič pride do stresa pri spiranju kvasne biomase s kislino z namenom preprečevanja morebitne kontaminacije z bakterijami pri ponovni inokulaciji in nato še pri inokulaciji pivine s kvasno biomaso, kjer stres povzroči velika sprememba v osmotskem tlaku zaradi visoke vsebnosti sladkorja v pivini. Spiranje kvasne biomase poteka v kislini, namenjeni za živilsko uporabo. Pri tem pH pade v območje med 2,2 – 2,4 in posledično zaradi visoke koncentracije H^+ ionov pride do osmotskega stresa (Briggs, 2004). Drugi in najpomembnejši vir osmotskega stresa vključuje proces inokulacije kvasne biomase v pivino z visoko relativno gostoto.

Visok zunanji osmotski tlak vpliva na zmanjšanje živosti kvasovk, na rast in fermentacijsko sposobnost (Pratt in sod., 2003). Kvasovke se odzovejo na spremembo koncentracije topljenca v okolju na različne načine; v primeru, da gre za hipotonični stres, celica poveča svoj volumen, pri izpostavljenosti hipertoničnemu stresu pa se volumen celice zmanjša (Morris in sod., 1986).

2.5.3 Nižanje pH

Znotrajcelični pH je važna spremenljivka za vzdrževanje celičnega ravnotežja in membranskega transportnega sistema (Rowe in sod., 1994), saj imata skupaj s črpalko H^+ pomembno vlogo pri aktivnosti encimov, ki sodelujejo v glikolizi in glukoneogenezi. ATPaza v plazemski membrani ustvarja transmembranski potencial H^+ in regulira znotrajcelični pH, poleg tega je tudi gonilna sila, ki je pomembna pri privzemuhranil in s tem izrednega pomena za rast kvasovk (Serrano in sod., 1986). S pomočjo znotrajcelične

vrednosti pH je možno napovedati živost kvasnih celic in dejavnosti v rasti (Imai in Ohno, 1995).

Pri običajni fermentaciji lager piva se začetni pH, ki je okoli 5,5, zniža na pH okoli 4. K znižanju vrednosti pH prispeva nastajanje CO₂, ki je eden od končnih produktov metabolizma kvasovk in se ob povečani koncentraciji v raztopini pretvarja v ogljikovo kislino, izločanje organskih kislin in privzem pufernih spojin, kot so aminokisline in primarni fosfati, prisotni v pivini. Nadalje je bilo ugotovljeno, da razlika v pufrni kapaciteti ne zadostuje razlike v vrednosti pH, vendar k razlikam prispevajo kvasovke, ki tekom fermentacije izločajo protone (Coote in Kirsop, 1976). Končni pH je torej odvisen od pufrne kapacitete pivine, začetne vrednosti pH in obsega rasti kvasovk.

2.5.4 Anaerobni prehod

Čeprav je fermentacija piva anaerobni proces, je začetna koncentracija kisika zelo pomembna, saj ga kvasovke potrebujejo za sintezo sterolov, ki so sestavni del celične membrane (Aries in Kirsop, 1977). Začetna koncentracija kisika, potrebna v pivini, je odvisna predvsem od seva kvasovk in relativne gostote pivine (Lima in sod., 2011). Najmanjša koncentracija kisika je vsaj 10 mg/L, ki se porabi v nekaj urah po inokulaciji, kar privede do akumulacije CO₂ in s tem do anaerobnih pogojev in začetka fermentacije (Waites in sod., 2001).

V območju od 0,5- 4,0 bara absolutnega tlaka CO₂ pride do zmanjšane rasti in živosti celic, vendar nima vpliva na glikolizo, posledično zaradi zavirnalnega učinka na rast kvasovk vpliva na rahlo zmanjšano hitrost fermentacije (Knatchbull in Slaughter, 1987). Povečanje parcialnega tlaka CO₂ v fermentorju upočasni hitrost fermentacije, vpliva na končno koncentracijo amilnega alkohola in obsega rasti kvasovk, medtem ko se končni pH zniža.

Ogljikov dioksid ima različen učinek na produkcijo in odstranjevanje diketonov in njihovih prekurzorjev, ki jih tvorijo kvasovke. Izjema so zelo nizke temperature in tlak, pri katerih nima učinka na odstranjevanje omenjenih spojin v zaključni fazni fermentaciji (Arcay-Ledezma in Slaughter, 1984). Posledica povečanega tlaka ogljikovega dioksida se kaže v zmanjšani koncentraciji aromatičnih spojin in estrov (Drost, 1977). Vpliv anaerobnih pogojev na kvasovke se kaže tudi v več celičnih funkcijah, vključno s spremembami v delitvi in velikosti celic, izražanju genov, spremenjeni presnovi, privzemni aminokislini in celični steni. Prehod iz aerobnega okolja v anaerobnega ne predstavlja direktne grožnje v primerjavi z drugimi stresi. Na spremembo metabolizma zaradi porabe kisika vplivajo spremembe v izražanju 938 genov (Lai in sod., 2005).

2.5.5 Toksičnost etanola

Primarni namen kvasne biomase pri fermentaciji piva je sinteza etanola iz fermentabilnih sladkorjev in tvorba drugih aromatično aktivnih spojin (Casey in Ingledew, 1986). Pomemben produkt fermentacije je tudi primerno živa in vitalna kvasna biomasa, ki jo je mogoče uporabiti v nadaljnjih fermentacijah, zato tvorba primarnega produkta ne sme biti na račun kakovosti kvasne biomase (Stewart, 2001). Med fermentacijo vsebnost alkohola naraste in posledično so kvasne celice izpostavljene toksičnosti etanola, ki zmanjšuje vitalnost in živost. Pri običajnih fermentacijah piva je alkoholna stopnja v območju med 3 in 6 vol. %, pri fermentacijah z visoko gostoto pivine pa lahko stopnja alkohola presega tudi 10 % (Briggs, 2004). Znano je, da ima etanol velik vpliv na fiziologijo kvasovk, saj zavira celično rast, zmanjšuje živost, velikost celic, dihanje in privzem glukoze (Pascual in sod., 1988). Poleg tega povzroča spremembe v prepustnosti membrane, v procesu modifikacije lipidov, celični strukturi in funkciji (Mizoguchi in Hara, 1997). Vpliva tudi na inaktivacijo encimov in spremeni aktivnost različnih metabolnih poti, niža pH citoplazme in posledično vpliva na aktivnost plazmske ATPaze, ki pri nizki stopnji etanola celo izboljša svoje delovanje (Petrov in Okorokov, 1990).

Odziv na etanolni stres se pri kvasovkah kaže v večjih fizioloških spremembah, kot so: povišana vsebnost enkrat nenasičenih maščobnih kislin v celični membrani, še posebej oleinske kisline in s sočasnim zmanjševanje nasičenih maščobnih kislin, kot je palmitinska kislina; povišana vsebnost trehaloze (Kim in sod., 1996) stimulacija sinteze stresnih proteinov in pridobitev termotolerance (Odumeru in sod., 1992) ter povišana aktivnost mitohondrijske superoksid dismutaze (Costa in sod., 1993). Stopnja etanolne tolerance kvasovk določa njihovo primernost za fermentacijo in možnost uporabe za kasnejše fermentacije (Lentini in sod., 2008). Ostali okoljski dejavniki, ki vplivajo na etanolno toleranco kvasovk, so še osmotski stres, stranski metaboliti fermentacije, način hranjenja s substratom in sestava medija (Casey in sod., 1984; D'Amore in sod., 1989). Predhodna izpostavitev nižjim vsebnostim etanola lahko zviša stopnjo tolerance na nadaljnjo izpostavljenost toksičnim vsebnostim etanola (Odumeru in sod., 1992). Pomembno vlogo pri zaščiti kvasovk pred etanolnim stresom imajo Mg^{2+} ioni, ki zvišajo toleranco na etanolni stres. Ugotovljeno je bilo, da je bila ob dodatku Mg^{2+} ionov povečana tvorba etanola pri fermentaciji pivine z visoko gostoto (D'Amore in sod., 1988).

Uporaba pivine z visoko gostoto je v mnogih pivovarnah postala ustaljena praksa, saj enostavno poveča proizvodno kapaciteto in zmanjša stroške, vendar je omejena s toleranco kvasovk na stres in njihovo fermentacijsko zmogljivostjo (Bieck in sod., 2007).

2.5.6 Stres zaradi pomanjkanja hrani

2.5.6.1 Privzem in omejitve vira ogljika

Pivske kvasovke *Saccharomyces spp.* pridobivajo vir ogljika in energije večinoma iz preprostih fermentabilnih sladkorjev; od monosaharidov lahko izkoriščajo glukozo, manozo, fruktozo, galaktozo, pentozo in ksilulozo. Od disaharidov lahko izkoristijo saharozo in maltozo. Trisaharide, kot sta maltotriosa in rafinoza, lahko hidrolizirajo le nekateri sevi. Ostale nefermentabilne spojine, kot sta etanol in glicerol, lahko kvasovke izkoristijo kot vir ogljika v aerobnih razmerah za rast. Lager sev *Saccharomyces carlsbergensis* lahko izkoristi še melibozo in dekstrin, kar pa na splošno ne velja za ale seve *Saccharomyce cerevisiae*. Kvasovke v zgodnji fazи fermentacije hitro porabijo glukozo, fruktozo in saharozo. Najprej hidrolizirajo saharozo s pomočjo periplazemskega encima β -D-fruktofuranozidazo, ki se nahaja na celični ovojnici. Produkta hidrolize, glukoza in fruktoza, nato vstopita v celico z olajšano difuzijo (Heggart in sod., 1999). Privzem maltoze je reguliran z geni MAL, ki so regulirani z indukcijo maltoze in represijo glukoze. Gen MAL je utišan, kadar je koncentracija glukoze višja od 0,4 ut.% (Walker, 1998).

Po fermentaciji je v pivini majhna koncentracija sladkorjev, kar neposredno vpliva na nizko relativno gostoto piva. Meja atenuacije je določena z značilnostmi kvasovk in določa najnižjo relativno gostoto piva, ki jo kvasovke lahko dosežejo. Večinoma je relativna gostota med 2-3°P. Nezmožnost doseganja meje atenuacije kvasne kulture je pogosto pokazatelj slabe vitalnosti in živosti (Heggart in sod., 1999).

2.5.6.2 Privzem in omejitve vira dušika

Pivina vsebuje bistvene vire dušika, ki ima pogosto anabolno vlogo in ga kvasovke zlahka uporabijo za sintezo celičnih proteinov in encimov (Tenge, 2009). Ustrezna količina dušika je ključna za visoko celično živost (Patel in Ingledew, 1973). *S. cerevisiae* je nediazotrofična, kar pomeni, da kot vir dušika ne more asimilirati atmosferskega dušika, in ne-proteolitična, kar pomeni, da ne more uporabljati proteinov kot vir dušika (Walker, 2004).

V pivovarski dejavnosti vire dušika razdelimo na izkoristljive in neizkoristljive. Izkoristljivi viri dušika v pivini so različne spojine, ki vsebujejo dušik, vključno z amonijevimi solmi, aminokislinami in peptidi. Pivske kvasovke imajo omejeno zunajcelično proteolitično zmogljivost (Jones, 1991), zato proteini in polipeptidi, ki so prisotni v pivini po fermentaciji, ostanejo v pivu (Briggs, 2004). Neodvisno od pivovarskih

pogojev poteka med fermentacijo privzem aminokislin vedno v striktnem vrstnem redu; najprej kvasovke porabijo skupino A aminokislin (glutamin, glutamat, aspargin, aspartat, serin, treonin in lizin), nato sledi privzem iz skupine B aminokislin (valin, metionin, levcin, izolevcin, histidin), ki poteka mnogo počasneje, sledi skupina C aminokislin (glicin, fenilalanin, tirosin, triptofan, alanin), ki se porabljajo samo, kadar ni več aminokislin iz skupine A. Za uporabo prolina, ki predstavlja skupino D, in ga je v pivini v izobilju, kvasovke potrebujejo anaerobne pogoje (Tenge, 2009). Aminokisline iz skupin A in B se transportirajo v celico s specifičnimi permeazami, skupina C pa je privzeta s splošno permeazo. Ko gre aminokislina skozi transaminazni sistem, ki ji odstrani amino skupino, se lahko slednja uporabi za sintezo nove aminokisline in tako zagotovi nujno oskrbo, neodvisno od privzema (Hammond, 1993). Med fermentacijo ima vrstni red vnosa aminokislin takojšne posledice. Valin je nujno potreben za rast kvasovk, ampak je lahko uporabljen šele, ko se porabijo vse aminokisline iz skupine A, zato ga celica sintetizira. Med sintezo nastajajo stranski produkti, kot je acetolaktat, ki se zunajcelično pretvorí v diacetil. Nastaja toliko časa, dokler se ne porabijo aminokisline iz skupine A in celica začne privzemati valin. Tako metabolizem aminokislin neposredno vpliva na kakovost piva (Tenge, 2009).

2.5.7 Hladni šok

Lager fermentacije potekajo pri temperaturah med 6 in 15 °C. Ko se fermentacija zaključi, je potrebno ohraniti kvasovke v čim boljšem fiziološkem stanju, da preprečimo okužbe in ohranimo enako živo in vitalno stanje kvasovk (Bulton in Quain, 2001; O'Connor-Cox, 1998). To se doseže z nizko temperaturo, saj nizke temperature omejujejo rast in dobro ohranijo živost kvasne biomase skozi daljše časovno obdobje (Aguilera in sod., 2007). Temperature pri pobiranju, shranjevanju in spiranju s kislino so pod 4 °C in med temi postopki so kvasovke izpostavljene hladnemu šoku (Phadtare in sod., 1999). Vse te značilnosti kažejo, da imajo kvasovke *S. cerevisiae* mehanizme, ki jim omogočajo preživetje in prilagoditev na nizke temperature; odziv ni zanimiv samo z biološkega stališča, pomemben je tudi za tehnološke aplikacije (Aguilera in sod., 2007).

Fiziološke posledice zaradi nizke temperature se kažejo predvsem v pretočnosti membrane, ki je sestavljena v večji meri iz oleinske in palmitooleinske kisline, v sledovih pa sta prisotni palmitinska in stearinska kislina (Shinitzky, 1984). Nižanje temperature vodi v bolj urejeno strukturo membrane, kar poslabša njeno pretočnost in prehod snovi. Membrana z nižanjem temperature preide iz tekoče kristalne oblike v stanje gela (Thieringer in sod., 1998). Ta transformacija poslabša delovanje membranskih proteinov, ki skrbijo za prenos presnovnih produktov in beljakovin skozi membrano. Prilagoditev na nizke temperature se kaže v povečanju nenasičenih maščobnih kislin, cis in dvojnih vezi, krajšanju verig in razvejanosti metilnih skupin (Russell, 1989). Druga fiziološka posledica

zaradi nižanja temperature je zmanjšanje hidrofobnih interakcij med skeletnim ogljikom polipetidov in stranskimi verigami aminokislin. To povzroči izpostavljenost nepolarnih regij vodnemu okolju in tveganje za denaturacijo proteinov (Gounot in Russell, 1999).

Odgovor na nizke temperature se kaže tudi v spremenjenem izražanju nekaterih genov in s tem je spremenjeno fiziološko stanje. Zanj je značilen zmanjšan membranski transport, kopiranje nepravilno zvitih proteinov in zmanjšana aktivnost encimov. Zgodnja faza odziva na znižanje temperature vključuje prilagoditev celične membrane in preprečuje destabilizacijo sekundarnih struktur RNA, da lahko poteka učinkovita translacija beljakovin. Poznejša faza vključuje zvišanje ravni regulacije genov GRS, vključno s »heat shock« proteini in encimi, vključenimi v presnovo glicerola in trehaloze (Schade in sod., 2004).

2.6 METODE DOLOČANJA ŽIVOSTI IN VITALNOSTI

2.6.1 Metode določanja živosti

Kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae* je zelo uporaben modelni organizem za proučevanje celičnega odziva na različne vrste stresa. Določanje živosti celic je ena od najbolj pogosto uporabljenih metod pri krio- in genotoksičnih analizah pri različnih vrstah kemičnih, fizikalnih in okoljskih dejavnikov. Analiza parametrov živosti je zelo pomembna v industrijskih procesih, kjer se uporabljajo mikroorganizmi (Nikolova in sod., 2002). Na splošno je živost celic definirana kot delež živih celic v celotni populaciji. Omenjeni parameter lahko določimo z različnimi metodami, ki so opisane v številnih raziskovalnih člankih. Za boljše razumevanje živosti so metode v nadaljevanju razvrščene glede na njihovo uspešnost in vrsto doseženih rezultatov.

Prva kategorija vključuje metode, ki temeljijo na sposobnosti kvasovk, da rastejo na trdnem ali tekočem mediju. Ena izmed najpogosteje uporabljenih metod v tej kategoriji je štetje enot CFU, ki smo jo uporabili tudi v našem eksperimentu. Obstajajo še druge metode, kot so "spotting" test, merjenje inhibicijske cone rasti in določanje rasti v tekočem mediju. Prednosti teh metod so predvsem v enostavnosti uporabe in nizkih stroških izvedbe, medtem ko so njihove slabosti dolg čas čakanja na rezultate. Čeprav prej omenjeni preskusi omogočajo oceno stopnje zaviranja rasti, ne zagotavljajo ocene živih kvasnih celic ali celic, ki se ne morejo razmnoževati (Kwolek-Mirek in Zadrag-Tecza, 2014).

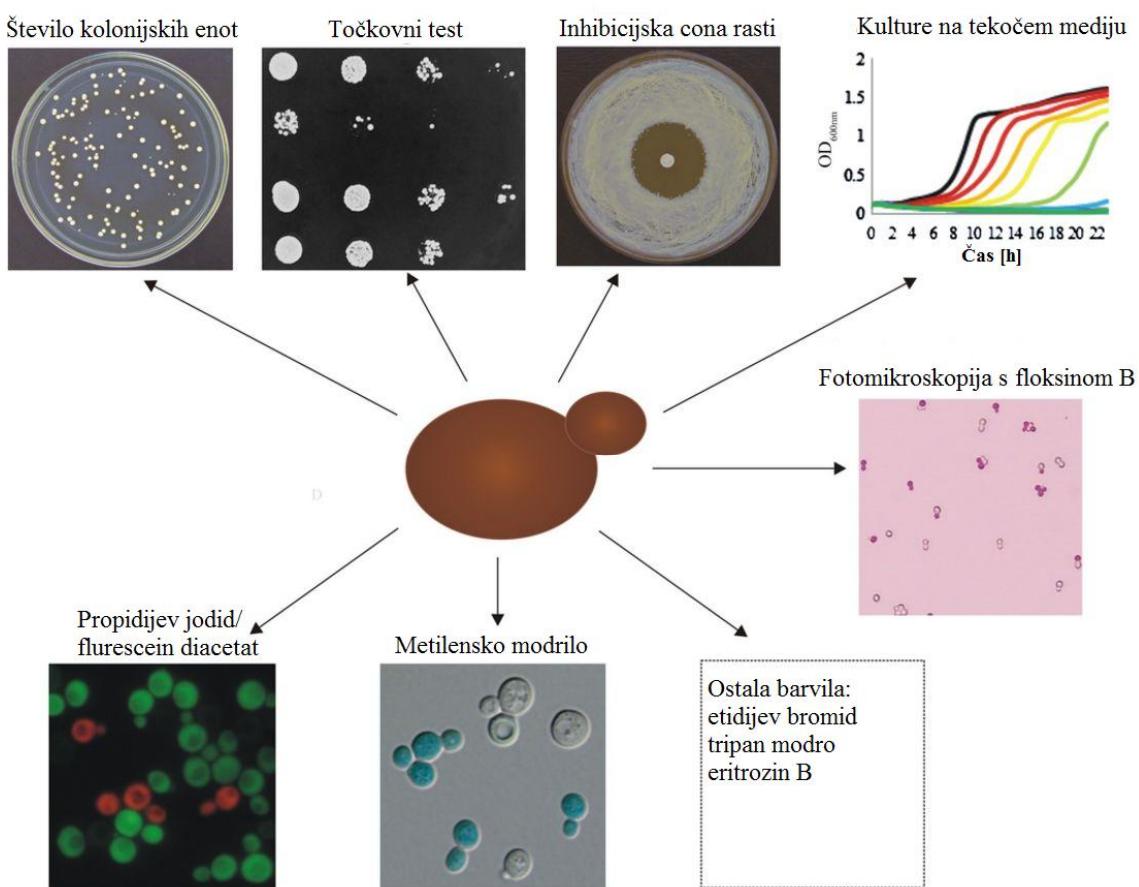
Druga kategorija metod določanja živosti celic temelji na barvanju z barvilkom. V tem primeru se lahko uporabljajo tako barvila za kolorimetrične metode kot tudi fluorescentna barvila. Mehanizem delovanja omenjenih barvil je odvisen od lastnosti celične membrane,

ki ločuje notranjost celice od zunanjega okolja. Poškodbe celične membrane običajno vodijo v celično smrt. Barvila, ki se uporablajo za določanje živosti celic, lahko razdelimo v dve podkategoriji (Kwólek-Mírek in Zádrag-Tecza, 2014). Prva so barvila, ki so odvisna od sprememb v celovitosti in funkcionalnosti celične membrane. Ta barvila so pri fiziološkem pH v anionski obliki in ne morejo prodreti v žive celice zaradi negativnega naboja celične membrane, kar pomeni, da jih nepoškodovana membrana živih celic blokira in tako prepreči njihov vstop v notranjost, lahko pa prodrejo v mrtve ali poškodovane celice in obarvajo jedro ali citoplazmo. Prisotnost barvil v celicah kaže na poškodbe membrane in celično smrt. Običajno uporabljeni barvila iz te skupine vključujejo fluorescentna barvila, ki se vežejo na DNA, kot so propidijev jodid (López-Amorós in sod., 1995), etidijev bromid (Aeschbacher in sod., 1986) ali kolorimetrična barvila, kot so tripan modro (McGahon in sod., 1995) in eritrozin B (Bochner in sod., 1989).

Druga podskupina barvil prodre tako v žive kot v mrtve celice, pri čemer žive celice lahko izčrpajo barvilo, kot na primer floksin B (Minois in sod., 2005), ali ga reducirajo, kot na primer metilensko modrilo (Painting in Kirsop, 1990) in ostanejo brezbarvne. Mrtve celice tega ne morejo narediti, zato ostanejo obarvane modro v primeru, ko uporabljamo metilensko modrilo, ali rdeče, kadar uporabljamo barvilo floksin B.

Omenjene metode zagotavljajo hitre in ponovljive rezultate. Poleg tega omogočajo opazovanje posamezne celice in tako razlikujejo žive celice od mrtvih celic in merijo delež obeh kategorij celic v celotni populaciji, torej omenjene metode za določanje živosti celic predstavljajo podatke o živih in mrtvih celicah v celotni populaciji. Vendar v mnogih primerih toksični učinki kemičnih ali fizikalnih dejavnikov ne vodijo neposredno v celično smrt. Takšni dejavniki lahko povzročajo vrsto morfoloških, znotrajceličnih ali metaboličnih sprememb, ki imajo za posledico nezmožnost delitve celic, kljub temu da celica še živi (Kwólek-Mírek in Zádrag-Tecza, 2014). Ta vidik predstavlja vitalnost celic, ki je opredeljen kot fiziološka sposobnost celice.

Metode določanja živosti



Slika 2: Metode, ki se uporabljajo za določanje živosti kvasnih celic (Kwolek-Mirek in Zadrag-Tecza, 2014)

2.6.2 Metoda določanja kultivabilnosti CFU

Rast in vzdrževanje mikrobov v petrijevih ploščah na medijih, ki vsebujejo agar, je že dolgo časa splošno uporabljeni praksa v mikrobiologiji. Tradicionalno je prednostna metoda za kvantitativno določanje čistih ali mešanih kultur, saj je zelo fleksibilna in relativno hitra. Temelji na razmazu serijskih redčitev in kasnejšem štetju enot, ki tvorijo kolonije (CFU) (Sieuwerts in sod., 2008).

2.6.3 Določanje živosti z uporabo metilenskega modrila, slikanjem pod mikroskopom in štetjem z računalniškim programom

Z omenjeno metodo dobimo hitro oceno odstotka živih celic v primerjavi s tradicionalno metodo štetja celic (določanje CFU), katere rezultati so nam na voljo šele po 3 ali 4 dneh po cepljenju. Metoda barvanja z metilenskim modrilm hitro obarva celice in rezultate o živosti celic lahko dobimo v nekaj minutah. Ko kvasnim celicam dodamo metilensko

modrilo, to prodre v notranjost celic in jih obarva. Žive kvasne celice, ki vsebujejo encime, lahko razbarvajo metilensko modrilo in ostanejo brezbarvne, pri čemer jih mrtve celice ne morejo, zato ostanejo obarvane. Metoda na zelo preprost in enostaven način razlikuje mrtve celice od živih, katere preštejemo pod mikroskopom (Painting in Kirsop, 1990). To naredimo tako, da celice nanesemo na Bürker-Türkovo števno ploščico, jim dodamo metilensko modrilo, nato pa jih slikamo pod mikroskopom, štetje celic na števnih komorah si olajšamo s pomočjo računalniškega programa ImageJ (Zupan in sod., 2013).

2.6.4 Določanje števila kvasnih celic s pomočjo optične gostote

Spektrofotometrično določanje optične gostote (OD) je najpogosteje uporabljen tehnik za ocenjevanje koncentracije celic v tekoči kulturi. Pomembno je, da izberemo primerno valovno dolžino, da dobimo kakovostne meritve. Metoda temelji na Beer-Lambertovem zakonu, ki opisuje absorpcijo svetlobe pri prehodu skozi ne povsem prozorno snov, saj je oslabitev vpadnega žarka v tanki plasti premosorazmerna debelini te plasti in jakosti vpadnega žarka, sorazmerni koeficient pa se imenuje absorpcijski koeficient. To omogoča racionalen pristop za izboljšanje natančnosti meritev optične gostote, ki se uporablja kot približek koncentraciji celic. Slabost te tehnike namreč je, da se optična gostota spreminja z velikostjo celic pri enaki koncentraciji celic (Myers in sod., 2013).

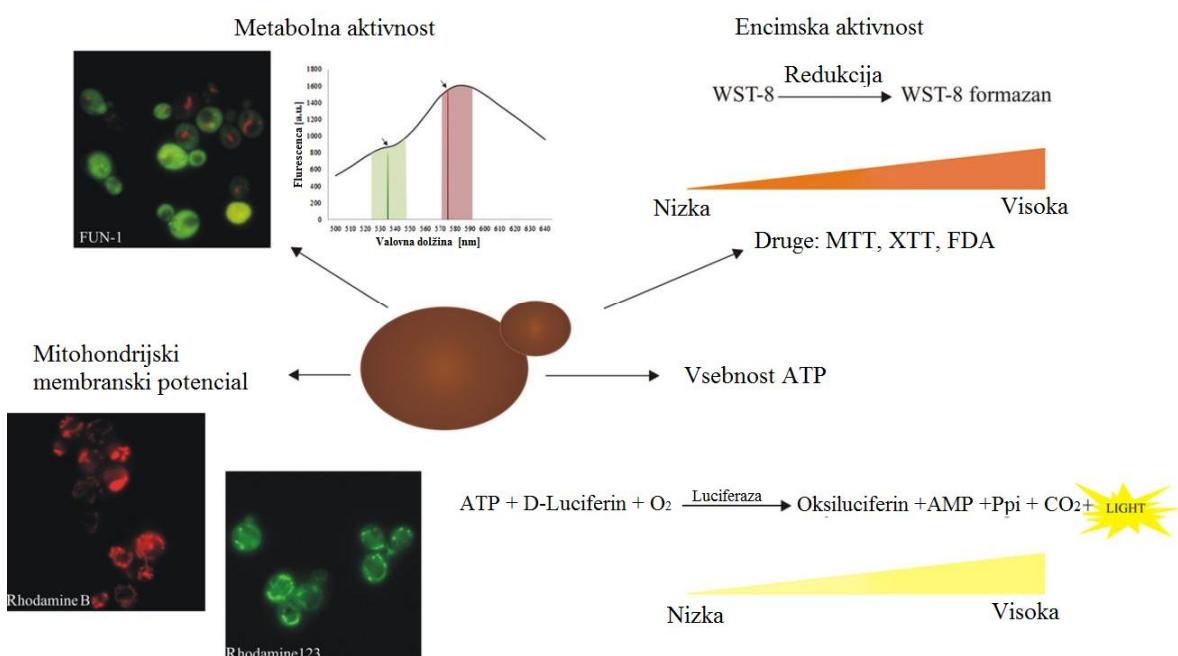
2.6.5 Metode določanja vitalnosti

Metode za določanje celične vitalnosti kvasa temeljijo na raziskavah različnih vidikov fiziološkega stanja celic. Generalno so razvrščene v tri kategorije: 1) določanje vsebnosti celičnega ATP na podlagi reakcije z luciferinom (Anséhn in Nilsson, 1984), 2) določanje mitohondrijskega membranskega potenciala, ki temelji na obarvanju z rodaminom 123 (Ludovico in sod., 2001) ali rodaminom B (Marchi in Cavalieri, 2008) in 3) določanje aktivnosti encimov, na primer esteraze, ki se obarva s fluorescin diacetatom (Breeuwer in sod., 1995), ali oksidoreduktaze, ki se obarvajo s tetrazolijev soljo MTT (Levitz in Diamond, 1985), XTT (Kuhn in sod., 2003), WST-8 (Tsukatani in sod., 2009) ali številnimi redoks encimi ter barvanje z resazurinom (Czekanska, 2011). V to kategorijo lahko vključimo tudi specifično barvilo za kvasovke FUN-1, ki je membrani prepustni nefluorescentni prekurzor, ki se pri aktivnosti znotrajceličnih encimov pretvori v fluorescentni produkt. Omenjeno barvilo omogoča razlikovanje med živimi (metabolno aktivnimi), metabolno oslabljenimi in mrtvimi celicami (Millard in sod., 1997). Slabost teh metod je, da zahtevajo uporabo napredne specialne opreme. Njihova dobra stran pa je, da dajejo zelo objektivne in merljive rezultate. Prednost teh metod je tudi, da omogočajo podrobno opredelitev presnovnega stanja celic, ki zagotavljajo boljšo podlago za

oblikovanje sklepov o mehanizmu dejavnikov, ki jih preiskujemo (Kwolek-Mirek in Zadrag-Tecza, 2014).

Pretočna citometrija se uporablja za kvantitativno merjenje optičnih lastnosti celic in lahko analizira nekaj tisoč celic v sekundi, ki potujejo v hitrem ozkem toku skozi snop svetlobe. Ta lahko določi tri parametre: direktni kot razpršene svetlobe (FSC), stranski kot razpršene svetlobe (SSC) in fluorescenco pri določeni valovni dolžini. S pomočjo izmerjenih parametrov lahko določimo približno maso celic, strukturo, površinske lastnosti in optično gostoto celic. Uspešno se uporablja za neposredno določanje živih celic, po barvanju z zgoraj omenjenimi fluorescentnimi barvili, ki različno obarvajo celice glede na njihovo aktivnost in integriteto celične stene (Deere in sod., 1998).

Metode določanja vitalnosti



Slika 3: Metode, ki se uporabljajo za določanje vitalnosti kvasnih celic (Kwolek-Mirek in Zadrag-Tecza, 2014)

2.6.6 Metoda določanja kinetike kvasovk z barvilo FUN1

FUN-1 [2-kloro-4-(2,3-dihidro-3-metil(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden)-1-fenilkinolinijev jodid] je fluorescentno barvilo, ki je membransko permanentna halogenirana cianidna spojina, katera se veže na nukleinske kisline (Millard in sod., 1997). Uporablja se v študijah kvasovkah in drugih gliv za spremljanje živost celic v raziskovalnih laboratorijih in testiranje aktivnosti glivnih okužb v kliničnih okoljih. Ko je plazmska membrana nepoškodovana, kvasne celice privzamejo barvilo FUN-1 in pri tem citosol fluorescira difuzno zelene barve (Essary in Marshall, 2009). Barvilo FUN-1 se nato transportira po

neznani metabolni poti v metabolno aktivnih celicah v vakuolo, kjer se nato pretvori v fluorescirajoče rdeče cilindrične intravakuolne strukture (CIVS), ki nastanejo v anaerobnih kot tudi aerobnih pogojih, vendar je njihov nastanek močno odvisen od temperature (Millard in sod., 1997). To barvilo se uporablja za določitev vitalnosti kvasovk, saj lahko le vitalne celice tvorijo CIVS (Essary in Marshall, 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Delovni organizem

V laboratorijskem poizkusu smo uporabili kvasni sev *Saccharomyces pastorianus* ZIM 2203 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete, s Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. V zbirki je bil shranjen na -80 °C, pred uporabo smo ga odtalili in ga oživili z inkubacijo na YPD petrijevih ploščah.

3.1.2 Trdno YPD gojišče

Direktno v 1 litrsko steklenico smo zatehtali 37,5 g YPD Broth (Sigma) in 15 g Agar (Biolife) ter dolili 750 ml destilirane vode. Steklenico smo dobro pretresli in raztopili večino sestavin, nato smo jo eno minuto dodatno segrevali v mikrovalovni pečici, da so se raztopile vse sestavine. Pred avtoklaviranjem smo rahlo odvili pokrovček, da smo preprečili nastajanje nadtlaka, zaradi katerega bi steklenica lahko počila. Na koncu smo steklenico prenesli v avtoklav in jo avtoklavirali ($t=15$ min, $T=121$ °C in $p=1,1$ bar). Po avtoklaviranju smo gojišče primerno ohladili, da smo ga lahko v laminariju razlili v pretijeve plošče, ko se je gojišče v petrijevih ploščah strdilo, smo jih do uporabe shranili v hladilno omaro.

3.1.3 Tekoče YPD gojišče

V tekočem gojišču smo namnožili kvasno biomaso, ki smo jo uporabili za inokulacijo pivine pri prvi fermentaciji. Za pripravo gojišča smo raztopili 5 g suhega gojišča YPD (Sigma) v 100 ml destilirane vode in ga avtoklavirali.

3.1.4 Pivina

Za fermentacije smo uporabili pasterizirano lager pivino iz pivovarne Laško. Ustreznost pivine smo pri vsaki uporabi preverili z negativno kontrolo. Izvedli smo jo z nanosom 0,1 ml pivine na dve petrijevi plošči YPD in inkubirali pri 37 °C tri dni.

3.1.5 Fosfatni pufer z metilenskim modrilom

Fosfatni pufer z metilenskim modrilom (pH 4,6), ki se uporablja zaobarvanje mrtvih celic kvasovk, smo pripravili po objavljenem protokolu (Heggart in sod., 2000). Za uporabo omenjenega fosfatnega pufra z metilenskim modrilom smo se odločili na podlagi priporočila organizacije American Society of Brewing Chemist. Najprej smo pripravili raztopino A. To smo naredili tako, da smo zatehtali 0,05 g metilenskega barvila in ga raztopili v 250 ml destilirane vode. Sledila je priprava raztopine B, tako da smo 6,8 g KH_2PO_4 raztopili v 250 ml destilirane vode. Za pripravo raztopine C smo zatehtali 1,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ in raztopili v 50 ml destilirane vode. Nato smo v 249,38 ml raztopine B dodali 0,625 ml raztopine C in dobili raztopino D. Na koncu smo pripravili raztopino E tako, da smo zmešali 250 ml raztopine D in 250 ml raztopine A. Tako pripravljenemu

fosfatnemu pufru z metilenskim modrilom smo še uravnali pH na 4,6 in ga sterilizirali z membransko filtracijo.

3.1.6 Določanje živosti kvasovk s setom Live/Dead (Thermo Fisher Scientific)

3.1.6.1 Pufer GH

Pufer GH se uporablja za ohranjanje fiziološkega pH in vzdrževanje strukture in funkcije encimov, zlasti pri nizkih temperaturah. Za pripravo GH pufra smo zatehtali sestavine iz spodnje preglednice 1 v čašo in dodali približno 25 ml dH₂O. Nato smo čašo postavili na magnetno mešalo in pustili, da so se vse sestavine raztopile. Raztopino smo prelili v merilni valj in dopolnili z dH₂O do 30 ml. Na koncu smo pufer še sterilizirali z membransko filtracijo.

Preglednica 1: Priprava GH pufra

Sestavina	Količina
HEPES	0,1192 g
Glukoza	1,1 g
dH ₂ O	30 ml

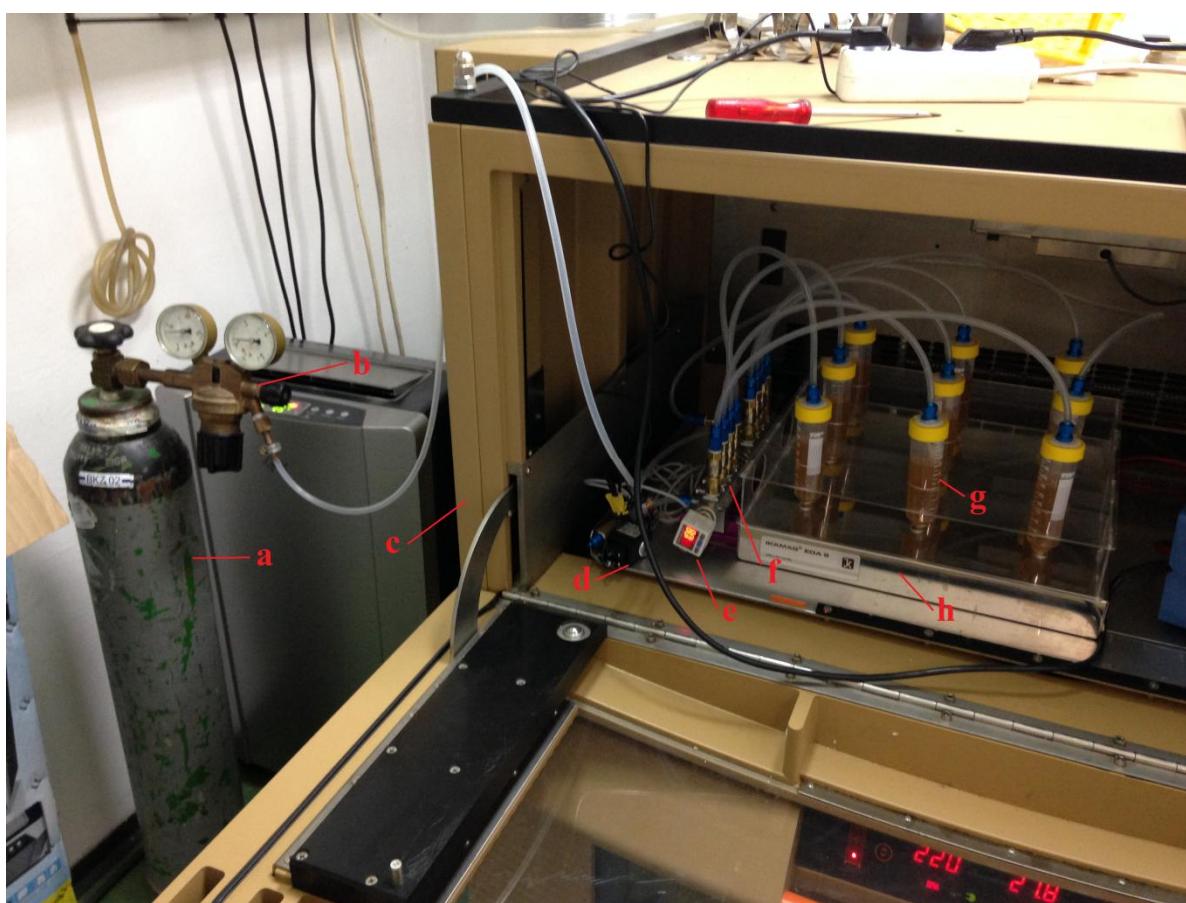
3.1.6.2 Barvilo FUN1

Live/Dead Yeast Viability set vsebuje dve barvili, to sta FUN1 in Calcofluor White M2R. Proizvajalec navaja, da je možno uporabiti barvilo FUN1 posamično ali v kombinaciji z Calcofluor White M2R za določanje metabolne aktivnosti kvasovk, s pomočjo fluroscentne mikroskopije ali s katero drugo instrumentalno metodo (Molecular Probes, 2001). V našem primeru smo metabolno aktivnost merili samo z barvilmom FUN1. Proizvajalec priporoča redčenje barvila med 100 µM in 1,6 µM. Pri izdelavi umeritvene krivulje smo ugotovili, da je najmanjša koncentracija, ki jo lahko uporabimo pri merjenju, 3,0 µM. Barvilo smo pripravili tako, da smo v 400 µl GH pufra raztopili 0,24 µl 10 mM barvila FUN1. Na koncu smo zmešali razredčeno barvilo z vzorcem v razmerju 1:1 in dobili končno koncentracijo barvila 3 µM.

3.1.7 Mikrofermentacijski sistem

Glavni deli sistema so: inkubator, magnetno mešalo, jeklenka z reducirnim ventilom, regulacijski sistem tlaka, razdelilna letev za povezavo vseh delov sistema in fermentorji. V poizkusu smo posnemali parametre, ki so prisotni na industrijskem nivoju: temperatura, hitrost fermentacije, hidrostatski tlak, tlak nad tekočo fazo, parcialni tlak CO₂ in hitrost mešanja. Zaradi narave poizkusa smo izdelali sistem, v katerem lahko kontroliramo omenjene parametre. Najprej smo izdelali devet fermentorjev, od tega so bili trije

namenjeni pobiranju vzorcev za kasnejše analize. Iz preostalih šestih pa smo po koncu fermentacije pobrali biomaso, ki smo jo uporabili za reinokulacijo. Za izdelavo slednjih smo uporabili falkonke (50 ml), ki smo jim predelali pokrovčke. Na vrhu pokrovčkov smo namestili priključke za silikonsko cevko. Druga modifikacija, ki smo jo naredili, je bila namestitev silikonskega tesnila, da so fermentorji tesnili. Fermentorje smo nato s silikonskimi cevkami povezali na razdelilno letev. V razdelilno letev smo preko silikonske cevke iz jeklenke dovajali plinsko mešanico 20 % CO₂ in 80 % N₂. Za poizkus smo uporabljali 40 kilogramsko jeklenko z reducirnim ventilom tlaka, ki smo ga nastavili na ~ 1,1 bar. Tlak v sistemu smo natančno kontrolirali s pomočjo elektronskega merilnika, povezanega z elektromagnetnim ventilom, ki je posredno preko elektromagnetskoga ventila odvajal odvečno količino plina. Tlak v sistemu je bil konstantno 1,10 bar s standardnim odklonom 0,03 bara. Elektronski merilnik tlaka smo namestili direktno na razdelilno letev. Elektromagnetni ventil pa je bil z razdelilno letvijo povezan s silikonsko cevko, prav tako kot fermentorji in jeklenka. Mešanje z magnetnim mešalom je simuliralo mešanje v industrijskem fermentorju, ki nastane zaradi dvigovanja brozge na CO₂ mehurčkih, ki so posledica dihanja kvasovk. Uporabili smo magnetno mešalo z devetimi magnetnimi polji in mešalu prilagojenim stojalom, da so bili fermentorji nameščeni direktno nad magnetna polja. V fermentorje smo vstavili magnete velikosti 15 mm. Cel sistem, razen jeklenke, smo namestili v stresalnik Infors, s katerim smo kontrolirali temperaturo fermentacije.



Slika 4: Glavne komponente mikrofermentacijskega sistema, a- jeklenka, b-redukcirni ventil, c- stresalnik Inforce, d- elektromagnetni ventil, e- digitalni merilnik tlaka, f- razdelilna letev, g- fermentor, h- elektromagnetno mešalo

Preglednica 2: Sestavni deli mikrofermentacijskega sistema

Komponenta	Proizvajalec
Razdelilnik FR-8-1/8	Festo
Vtična spojka KD 1/8 – zunanjí navoj	Festo
Vtična spojka KS 1/8 – zunanjí navoj	Festo
Hitro-vijačeni priključek CK-1/8 – notranji navoj	Festo
Hitro-vijačeni priključek CK-1/8 – zunanjí navoj	Festo
Matica 1/8	Festo
Dvovijačnik raven 3/8	Festo
Zapiralni čep 3/8	Festo
Zapiralni čep 1/8	Festo
Elektromagnetni ventil 1/8 24V	Jakša
Napajalnik 24V	Sunny
Elektronski merilnik tlaka ISE30A	SMC
Rele 24 V	Matsushita
Silikonska cev 4x6	Rosil
Silikonska cev tesnilo 1,75 x 1	Rosil

Se nadaljuje ...

Nadaljevanje Preglednice 3: Sestavni deli mikrofermentacijskega sistema

Komponenta	Proizvajalec
Silikonska cev tesnilo 1 x 0,5	Rosil
Magnetno mešalo	IKAMAG
Stresalnik	INFORS
Magneti 15 mm	Brand
Jeklenka	OMV Istrabenz
Redukcirni ventil	Messer

3.2 METODE

3.2.1 Priprava biomase za prvo fermentacijo

Pred začetkom prve fermentacije smo na petrijeve plošče s trdnim gojiščem YEPD nacepili kvasovko vrste *Saccharomyces pastorianus*. Plošče smo inkubirali na 28 °C, aerobno, 3 dni. Del biomase smo nato prenesli v dve erlenmajerici, v katerih je bilo po 100 ml tekočega YEPD gojišča in erlenmajerici propagirali na stresalniku (Sartorius) pri pogojih 180 obr./min, 28 °C, aerobno, 3 dni. Po koncu propagacije smo suspenzijo prenesli v falkonke in jih centrifugirali pri 1500 g, 3 min. Gojišče smo zavrgli, biomaso pa resuspendirali v 10 ml pivine in jo ponovno centrifugirali. Nato smo določili koncentracijo celic v suspenziji z metodo ImageJ, ki je natančneje opisana spodaj. V devet fermentorjev smo razdelili tolikšno količino suspenzije celic, da je bila po dodatku pivine do končnega volumna 35 ml koncentracija celic $1,2 \times 10^7$. Za pozitivno kontrolo smo na petrijevo ploščo nacepili inokulirano pivino, za negativno kontrolo pa samo pivino.

3.2.2 Potek zaporednih fermentacij

Fermentacije so potekale v mikrofermentacijskem sistemu, ki je opisan zgoraj. V našem poizkusu smo izvedli 31 zaporednih fermentacij. Posamezna fermentacija je trajala en teden. Temperatura skozi fermentacije je bila do zadnjega dne 14 °C, dan pred koncem, ko je plato (P) dosegel okoli 5 °P smo jo zvišali na 15 °C. Pomembno je bilo, da smo v času fermentacije dosegli spremembo ekstrakta iz 11,6 °P na 2,3 °P. V našem primeru je bila optimalna hitrost mešanja za doseganje želenega platoja 80 obr./min variabilno, to pomeni, da se je smer mešanja izmenično menjala. Ker smo posnemali pogoje na industrijskem nivoju, smo nadzirali še nekaj dodatnih parametrov. V sistem smo uvedli 1,10 bara tlaka, ki je posnemal povprečni tlak, ki v industrijskih pogojih deluje na celice kot posledica a) hidrostatskega tlaka zaradi višine vodnega stolpca v industrijskem fermentorju (20 m), ter b) tlaka CO₂ nad tekočo fazo. Plinska mešanica, ki smo jo uporabili je bila 80% N₂ / 20 % CO₂. S tem smo posnemali parcialni tlak CO₂ nad tekočo fazo v industrijskem fermentorju in s tem tudi podobno koncentracijo raztopljenega CO₂ v tekoči fazi, medtem ko je dušik prispeval k simuliranju hidrostatskega tlaka med fermentacijo.

3.2.3 Zaustavitev fermentacije in pobiranje biomase

Ko je fermentacija dosegla želenih 2,3 °P (sedmi dan), je sledila zaustavitev fermentacije. To smo naredili tako, da smo fermentorje dali na led za eno uro. Med tem časom je biomasa flokulirala in se posedla na dno. Iz vsakega od šestih fermentorjev smo s pipeto pobrali po 3,5 ml srednjega sloja biomase in jo prenesli v erlenmajerico. Na koncu smo zbrano biomaso postavili za eno uro v hladilnik na 4 °C.

3.2.4 Ponovna inokulacija

Po eni uri v hladilniku smo biomasi dodali približno 100 ml ohlajene pivine, ki smo jo predhodno segreli na 100 °C, da ne bi vnesli okužbe s pivino. Sledilo je štetje celic pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ in določanje koncentracije celic; metoda je natančneje opisana spodaj. V fermentorje smo prav tako kot pri prvi fermentaciji razdelili tolikšno količino suspenzije celic, da je bila po dodatku pivine do končnega volumena 35 ml koncentracija celic $1,2 \times 10^7$. Prav tako smo izvedli pozitivno in negativno kontrolo.

3.2.5 Določanja stopnje flokulacije z uporabo modificiranega Helm testa

Biomaso štirih fermentorjev smo združili in sprali 3× s 35 ml dH₂O. Koncentracijo celic smo preverili s štetjem pod mikroskopom in odpipetirali 1 ml 1×10^8 celic/ml v 3 kontrolne (K) in 3 vzorčne (F) epice. Epice smo centrifugirali 3 min pri 1500 g in odstranili supernatant. V epice K smo dodali po 1 ml 50 mM EDTA, v epice F pa po 1 ml raztopine Helm B. Epice smo 5x obrnili in jih inkubirali 7 min. Po inkubaciji smo po 3x iz vsake epice odvzeli 100 µl suspenzije tik pod meniskusom in odpipetirali v mikrotitrsko ploščico. Nemudoma smo izmerili optično gostoto pri 600 nm.

Helm B	
Spojina	Količina
Kalcijev sulfat	0,51 g/l
Natrijev acetat	6,8 g/l
Ocetna kislina	4,05 g/l
Etanol	4 %
dH ₂ O	1 l

Preglednica 4: Priprava Helm B raztopine

Delež flokuliranih celic smo izračunali po spodnji enačbi :

$$\% \text{ flokul.} = (K - F)/K \quad \dots(1)$$

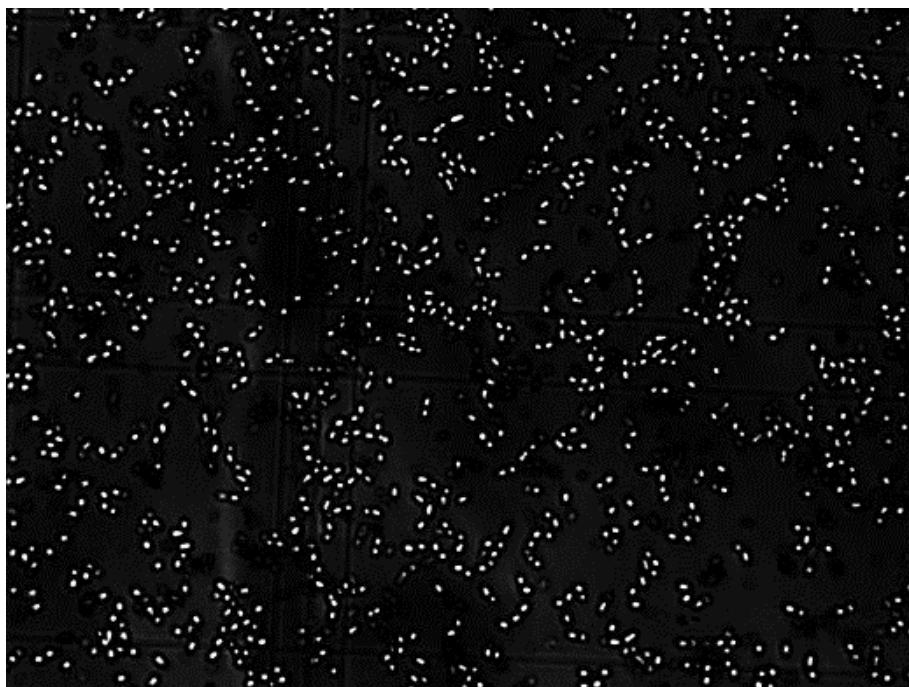
pri čemer je K ... optična gostota kontrole in F... optična gostota vzorca (Smart in sod., 2006).

3.2.6 Določanja kultivabilnosti na trdnem gojišču (določanje CFU)

Kultivabilnost na trdnem gojišču smo določali na petrijevih ploščah z YEPD Broth gojiščem. Po 24 urah fermentacije smo iz treh fermentorjev po predhodnem vorteksiranju odvzeli po 100 µl vzorca in izvedli redčitveno vrsto. Za redčenje smo uporabili 50 mM EDTA, ki preprečuje flokulacijo, zaradi katere ne bi dobili pravih rezultatov. Na petrijeve plošče smo razmazali po 100 µl posameznega vzorca v treh paralelkah. Uporabili smo redčitvi 10^{-3} in 10^{-4} . Vzorce smo nato inkubirali pri 37 °C tri dni. Vsaka od plošč je služila tudi za preverjanje morebitnih okužb fermentacijske brozge. Plošče redčitve 10^{-4} so bile neštevne. Plošče redčitve 10^{-3} smo prešteli s pomočjo modula »Cell counter« programske opreme Quantity One v4.6.5 (BioRad).

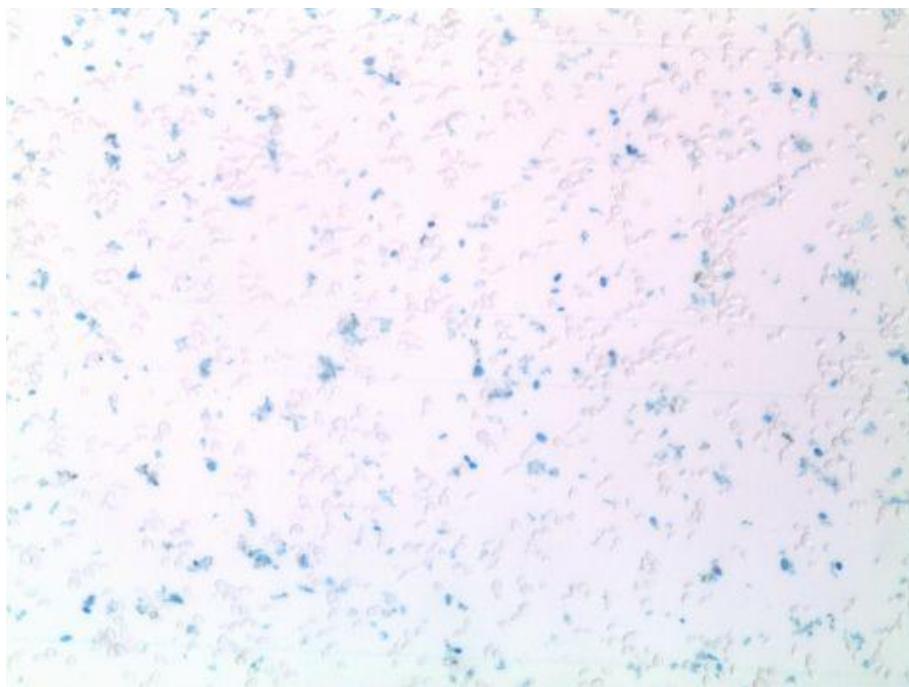
3.2.7 Določanje živosti z metodo ImageJ

Iz vsakega od treh mikrofermetorjev smo po predhodnem vorteksiranju odvzeli 700 µl vzorca in alikvit prenesli v 1,5 ml epice. Sledilo je centrifugiranje (3 min, 1500 ×g). Pivino oz. supernatant smo zavrgli, kvasno biomaso oz. pelet pa smo resuspendirali v 1000 µl GH pufra. Vzorce smo ponovno centrifugirali (3min, 1500 g), supernatant zavrgli, pelet pa resuspendirali v 700 µl GH pufra. Vsakemu od vzorcev smo odvzeli 20 µl alikvota in mu dodali metilensko modrilo razmerju 1:1 (v/v), ki je bil pripravljen po zgoraj opisanem postopku. V primeru, da so se celice prekrivale, smo naredili še dodatno redčitev z GH pufrom. Za določanje živih in mrtvih celic v vzorcih smo uporabili metodo štetja celic pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ verzija 1.43u (Zupan in sod., 2013). Vzorce smo s pipeto nanesli na 100 µm globok Bürker-Türkov hemocitometer in ga vstavili pod mikroskop. Šteli smo pri 40x povečavi. Optimalno sliko za štetje vseh celic smo naredili z nastavitevjo parametrov v programu Leica, s katerim smo nastavljali kamero mikroskopa (Leica DFC290). Uporabili smo dva različna načina nastavitev mikroskopa. Prvi način je bil za štetje živih celic: v tem načinu smo uporabili črno-bel način svetlobnega mikroskopiranja z maksimalno gamo in maksimalno zaprto zaslonko. Dobili smo sliko s črnim ozadjem, na njem pa svetle pike, ki so predstavljale žive celice. Mrtve celice so bile obarvane z metilenskim modrilom in zato niso svetile. Taka kontrastna slika je optimalna za analizo s programom ImageJ.



Slika 5: Način za slikanje živih celic za kasnejše štetje s programom ImageJ

V drugem načinu smo šteli mrtve celice, uporabili smo svetlobno mikroskopijo z maksimalno odprto zaslonko in povečanim nasičenjem. Pri tem se pokažejo modro obarvane pike, ki predstavljajo mrtve celice.



Slika 6: Način slikanja mrtvih celic za kasnejše štetje s programom ImageJ

Žive in mrtve celice skupaj predstavljajo vse celice. Sledilo je štetje celic s programom ImageJ; najprej smo odprli želeno sliko, ki smo jo posneli s programom Leica Application

Suite version 3.7.0. Za učinkovito štetje celic je bilo potrebno nastaviti mejo »Treshold«, od katere je odvisno, ali smo določali žive ali mrtve celice. Sliko smo nadalje procesirali z orodjem »Fill Holes«, ki poudari slabo označene celice in omogoči štetje le-teh. Nadaljevali smo z uporabo orodja »Watershed«, ki loči stikajoče se celice in brste od celice. S tem smo preprečili, da bi program preštel stikajoče celice kot eno celico. Za določanje števila celic smo uporabili orodje »Analyze particles«, ki selektivno presteje označene celice na podlagi njihove velikosti in krožnosti in tako zanesljivo izloči posamezne delce, ki ne predstavljajo celic. Koncentracijo živih, mrtvih ali vseh celic smo nato izračunali s pomočjo programa Excel, po naslednji formuli

$$C_{celic} = \frac{\text{število preštetih celic}}{V_{ImageJ} * 1000 * R} \quad \dots(2)$$

V_{ImageJ} predstavlja volumen ki ga omejuje vidno polje mikroskopa v programu ImageJ in znaša 0,032384 μl . V primeru, ko redčimo celice zaradi previsoke gostote, upoštevamo še redčitev (R) pri izračunu koncentracije celic. Delež posameznih celic smo izračunali po naslednjih formulah. Število vseh celic smo dobili tako, da smo sešteli žive in mrtve.

$$\% \text{ živih celic} = \frac{c_{živih\ celic}}{c_{vseh\ celic}} \times 100 \quad \text{in} \quad \% \text{ mrtvih celic} = \frac{c_{mrtvih\ celic}}{c_{vseh\ celic}} \times 100 \quad \dots(3)$$

3.2.8 Live/Dead set

Princip te metode temelji na merjenju kinetike metabolne aktivnosti kvasovk, s pomočjo komercialnega barvila FUN 1 (Invitrogen), katerega emisija je pri 530 nm. Po vstopu v celični metabolizem se pretvori, njegova emisija je tedaj 580 nm. Eksitacija znaša 660 nm. Za pretvorbo barvila FUN1 kvasovke izkoristijo običajne endogene biokemične mehanizme, ki so dobro ohranjeni med različnimi vrstami kvasovk in drugih gliv (Molecular Probes, 2001).

Iz vsakega od treh mikrofermetorjev smo po predhodnem mešanju odvzeli 700 μl vzorca in alikvot prenesli v 1,5 mL epice. Sledilo je centrifugiranje (3 min, 1500 g). Pivino oz. supernatant smo zavrgli, kvasno biomaso oz. pelet pa smo resuspendirali v 1000 μl GH pufra. Vzorce smo ponovno centrifugirali (3 min, 1500 g), supernatant zavrgli, pelet pa resuspendirali v 700 μl GH pufra. Vsakemu od vzorcev je bilo potrebno določiti koncentracijo celic in jo razredčiti z GH pufrom na koncentracijo 2×10^7 celic/ml. Za določanje koncentracije celic v vzorcih smo uporabili metodo štetja celic pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ, ki je opisana zgoraj. Koncentracijo celic smo določali v načinu štetja živih celic, saj so le te metabolno aktivne. Vzorce smo s pipeto nanesli na 100 μm Bürker-Türkov hemocitometer in ga vstavili pod mikroskop. Šteli smo pri 40x povečavi. Nato smo dobljeno število vnesli v Excel, v katerem na podlagi formul

izračunamo koncentracijo celic v vzorcu, ki ga je potrebno razredčiti, da dobimo želeno koncentracijo celic $2,0 \cdot 10^7$ celic/ml. Najprej smo izračunali C_{celic} po naslednji formuli:

$$C_{celic} = \frac{\text{število preštetih celic}}{V_{ImageJ} * 1000 * R} \quad \dots(4)$$

V_{ImageJ} predstavlja volumen, ki ga omejuje vidno polje mikroskopa v programu ImageJ in znaša $0,032384 \mu\text{l}$. V primeru, da je koncentracija celic prevelika, pri štetju pod mikroskopom ne bi dobili točne vrednosti, ker se prekrivajo in posledično bi dobili napačne vrednosti. Zato moramo vzorec razredčiti in upoštevati redčitev (R) pri izračunu koncentracije celic.

Volumen vzorca, ki ga moramo razredčiti, izračunamo tako, da končni volumen ($V_{končni}$) in koncentracijo celic ($C_{končna}$) delimo z dejasko koncentracijo celic (C_{celic}) po naslednji formuli:

$$V_{suspenzije} = \frac{V_{končni} * C_{končna}}{C_{celic}} \quad \dots(5)$$

Na koncu dodamo volumnu suspenzije GH pufer do končnega volumna ($V_{končni}$).

Metabolno aktivnost smo določili po navodilih proizvajalca kita Live/Dead (Invitrogen) in sicer: na črno mikrotitrsko ploščico smo nanesli po $100 \mu\text{l}$ vsakega vzorca. Tuk pred meritvijo dodamo še $100 \mu\text{l}$ barvila FUN1 s koncentracijo $6 \mu\text{M}$. Tako pripravljena suspenzija celic ima končno koncentracijo celic 10^7 celic/ml in $3 \mu\text{M}$ barvila FUN1. Meritve vzorcev smo izvedli s čitalnikom mikrotitrskih ploščic Safire 2 (Tecan). Kinetiko vitalnosti kvasovk smo merili vsakih pet minut, skupaj eno uro. Po končani analizi smo dobljene podatke eksportirali v Excel in izračunali površino pod krivuljo v dveh območjih in sicer v prvem območju od a) 510 do 560 nm (nepretvorjeno barvilo FUN1) in v drugem območju od b) 560 do 610 nm (pretvorjeno barvilo FUN1). Površino pod krivuljo smo računali s pomočjo integrala:

$$\text{Površina pod krivuljo}_a = \int_{560}^{510} d(x) dt \quad \dots(6)$$

$$\text{Površina pod krivuljo}_b = \int_{610}^{560} d(x) dt \quad \dots(7)$$

Nato smo iz dobljenih površin izračunali razmerje med pretvorjeno in nepretvorjeno obliko barvila FUN1 (R_{FUN1}), tako da smo površino pod krivuljo b delili s površino pod krivuljo a:

$$R_{\text{FUN1}} = \frac{c_{\text{površina pod krivuljo } b}}{c_{\text{površina pod krivuljo } a}} \quad \dots(8)$$

S spektrofotometrom smo spremljali spremiščanje razmerja med pretvorjeno in nepretvorjeno obliko barvila FUN1. Končni rezultat (ΔR_{FUN1}) je predstavljal maksimalno spremembo razmerja po 60 min merjenja.

$$\Delta R_{\text{FUN1}} = R_{\text{FUN1}}(t=0) - R_{\text{FUN1}}(t=60 \text{ min}) \quad \dots(9)$$

Rezultat smo primerjali z umeritveno krivuljo (slika 9) in določili delež vitalnosti celic.

3.2.9 Določanje optične gostote (OD)

Iz vsakega od treh fermentorjev smo predhodno premešane vzorce suspenzije celic prenesli na prozorno mikrotitrsko ploščico, po 200 μl vzorca v treh paralelkah. Za izračun gostote celic moramo odšteeti optično gostoto pivine, zato smo prav tako v treh paralelkah pripravili še slepo probko, ki je neinokulirana pivina. Optično gostoto smo merili s čitalnikom mikrotitrskih ploščic Tecan. Merili smo absorbanco pri 650 nm. Koncentracijo celic dobimo tako, da odštejemo vrednost slepe probe od vrednosti izmerjenega vzorca, nato dobljeno vrednost poiščemo na umeritveni krivulji in odčitamo koncentracijo celic.

3.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV IZBRANIH METOD

Rezultate izbranih metod smo analizirali s pomočjo prostega dostopnega orodja za statistično obdelavo podatkov R. Izbrali smo deset (6, 7, 8, 18, 19, 20, 26, 27, 28, 29) ponovnih inokulacij, ki so bile najbolj zanimive za statistično obdelavo in podatke razvrstili v skupine. Skupine smo nato obdelali z določenimi statističnimi testi, pri tem smo želeli ugotoviti potencialne statistične razlike med metodami določanja živosti in vitalnosti. Najprej smo preverili normalnost porazdelitve v skupini s testom Shapiro-Wilk in homogenost varianc med skupinami s testom Levene. V primeru, da so podatki normalno razporejeni in so variance med skupinami homogene, smo izvedli ANOVA, v nasprotnem primeru smo podatke analizirali z neparametričnim testom Kruskal-Walis in testom Mann-Witney ob upoštevanju Bonferroni popravka stopnje zaupanja.

3.3.1 Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk

S Shapiro-Wilk statističnim testom določimo, ali podatki v skupini ustrezano normalni porazdelitvi. Podatkom razporejenim po velikostnem redu glede na njegov položaj pripisemo konstanto a_i , ki je določena na osnovi pričakovane velikosti podatkov, ki bi pripadali normalni porazdelitvi.

Enačba Shapiro-Wilk statističnega testa:

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2} \quad \dots(10)$$

W – rezultat testa; a_i – konstanta, $x_{(i)}$ – vrednost na položaju i, \bar{X} – povprečna vrednost

Nato smo preverili hipotezo H_0 : podatki spadajo v skupino z normalno porazdelitvijo, H_1 : podatki ne spadajo v populacijo z normalno porazdelitvijo. H_0 lahko zavrnemo, če je vrednost W pod kritično mejo in je pripadajoča P vrednost manjša od mejne vrednosti (Shapiro in Wilk, 1965).

3.3.2 Analiza homogenosti varianc s testom Levene

S testom Levene smo preverili homogenost varianc k-skupin.

Enačba Levene statističnega testa:

$$W = \frac{(N - k)}{(k - 1)} \frac{\sum_{i=1}^k N_i (Z_{i\cdot} - Z_{..})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - Z_{i\cdot})^2}, \quad \dots(11)$$

$$Z_{ij} = \begin{cases} |Y_{ij} - \bar{Y}_{i\cdot}|, & \bar{Y}_{i\cdot} \text{ is a mean of } i\text{-th group} \\ |Y_{ij} - \tilde{Y}_{i\cdot}|, & \tilde{Y}_{i\cdot} \text{ is a median of } i\text{-th group} \end{cases} \quad \dots(12)$$

$$Z_{..} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} Z_{ij}, \quad Z_{i\cdot} = \frac{1}{N_i} \sum_{j=1}^{N_i} Z_{ij} \quad \dots(13)$$

W – rezultat testa; N - število podatkov v vseh skupinah; k - število skupin; N_i - število podatkov v skupini i; Z_{ij} - absolutna razlika podatka j v skupini i od povprečja skupine i,

Z_{..} - povprečje zbranih podatkov Z_{ij} vseh skupin; Z_i - povprečje zbranih podatkov Z_{ij} skupine i.

Nato smo preverili hipotezo, H₀: variance vseh skupin so homogene, H₁: vsaj en par varianc skupin ni homogen. H₀ zavrnemo, če dobijena vrednost W preseže zgornjo kritično vrednost F distribucije s k-1 in N-k prostostnih stopenj pri izbrani stopnji zaupanja (Olkin, 1960; Brown in Forsythe, 1974).

3.3.3 Analiza podatkov s testom enofaktorske ANOVA

Z analizo varianc (ANOVA) preverimo, ali so povprečja dveh ali več neodvisnih skupin vzorcev statistično enaka ob naprej predpisani stopnji tveganja α . Je njenostavnejši primer ANOVE, ki temelji na primerjavi k vzorcev. Vsak j-ti vzorec ima nj meritev, pri tem testiramo, ali so vsa povprečja iz iste populacije. ANOVA testira ničelno hipotezo H₀: vsi vzorci iz dveh ali več skupin izhajajo iz populacije s statistično enakimi povprečnimi vrednostmi.

Tukey HSD test temelji na večkratni primerjavi in statističnem testu, ki ga izvedemo v nem koraku. Lahko ga uporabljamo za analizo neobdelanih podatkov ali pa v povezavi z ANOVA (Post-hoc analizo), da poiščemo srednje vrednosti, ki se značilno razlikujejo od drugih in nam pove, med katerimi podskupinami prihaja do statistično značilnih razlik.

Enačba Tukey HSD testa:

$$q_s = \frac{Y_A - Y_B}{SE}, \quad \dots(14)$$

Y_A je večja srednja vrednost od dveh, ki jih primerjamo, Y_B je manjša srednja vrednost od dveh, ki jih primerjamo, SE je standardna napaka podatkov.

Qs vrednost nato primerjamo z vrednostjo q v gledanem območju porazdelitve. Če je q_s vrednost večja od vrednosti q_{kritični}, pridobljene iz distribucije pomeni, da se srednji vrednosti značilno razlikujeta.

Koefficient zaupanja za enako velike vzorce je natanko 1- α , v primeru, da vzorci niso enako veliki, je koeficient zaupanja večji od 1- α . Tukey HSD metoda je konzervativna, če obstajajo neenake velikosti vzorcev.

H_0 : potrdimo v primeru, ko so vse skupine iz iste populacije neodvisne, normalno porazdeljene, s homogeno varianco in njihova povprečja so statistično enaka ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n$).

3.3.4 Analiza podatkov z neparametričnim testom Kruskal-Walis

S Kruskal-Wallis neparametričnim testom smo ugotovili, če sta vsaj dve skupini med seboj statistično značilno različni. Test temelji na rangiranju podatkov: najprej podatke vseh skupin uredi po velikostnem redu in rangira vrednosti od 1 do N, ki je število vseh podatkov. Nato se vsakemu podatku določi vrednost ranga, ki ga zaseda na lestvici. Sledi izračun vsote pripadajočih rangov za vsako skupino in potrditev hipoteze H_0 : skupine prihajajo iz iste populacije. H_0 lahko zavrzemo, če dobljena vrednost H preseže kritično vrednost pri izbrani stopnji zaupanja. Test Kruskal-Walis nam ne pove, katere skupine se med seboj statistično značilno razlikujejo; to smo nadalje ugotavljali s serijo post-testov Mann-Whitney z Bonferronijevo korelacijo.

Enačba neparametričnega testa Kruskal-Walis:

$$\begin{aligned} H &= \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^g n_i \left(\bar{r}_{i \cdot} - \frac{N+1}{2} \right)^2 \\ &= \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^g n_i \bar{r}_{i \cdot}^2 - 3(N+1). \end{aligned} \quad \dots(15)$$

N - število vseh podatkov; $r_{i \cdot}$ - rang podatka na mestu i; n_i - število vrednosti v skupini i.

V primeru, da hipoteza H_0 drži, statistika testa Kruskal-Walis - H sledi χ^2 (chi square) porazdelitvi s $k-1$ prostostnih stopenj.

3.3.5 Analiza podatkov s testom Mann-Whitney

Mann-Whitney neparametrični test (U-testom) je neparametrični preizkus ničelne hipoteze, ki nam pokaže, da dve skupini iz populacije nasprotujeta alternativni hipotezi še posebej, da ima določena populacija večje vrednosti v primerjavi z drugimi. Temelji na razvrščanju in rangiranju podatkov iz dveh skupin, tako da jih razvrsti po velikosti, nato pa vsakemu podatku dodeli vrednost ranga od 1 do N (N je število vseh podatkov). Iz dobljenih rangov izračuna vsoto R za vsako skupino.

Enačba Mann-Whitney testa:

$$U_1 = R_1 - \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} \quad \dots (16)$$

R_1 - vsota rangov skupine 1, n_1 - število podatkov v skupini 1.

Nato preverimo hipotezo, H_0 : skupini prihajata iz enakih populacij, zavrnemo jo lahko v primeru, ko dobljena vrednost z preseže kritično vrednost z pri izbrani stopnji zaupanja (Mann in Whitney, 1947).

Ob predpostavki, da statistika-U sledi normalni porazdelitvi, se manjšo od dobljenih vrednosti uporabi za izračun z-vrednosti.

$$z = \frac{U - m_U}{\sigma_U}, m_U = \frac{n_1 n_2}{2}, \sigma_U = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}. \quad \dots (17)$$

m_U - povprečna vrednost U; σ_U - standardni odklon U.

3.3.5.1 Korelacija Bonferroni

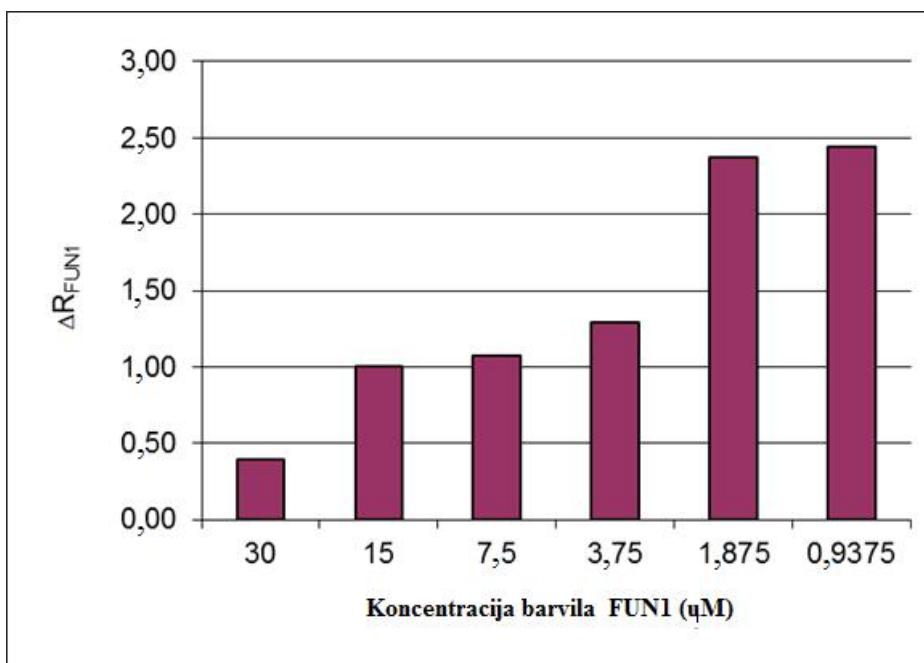
V primeru, da uporabljam test Mann-Whitney za primerjavo več skupin, ga je potrebno opraviti za vsak par skupin. V takšnem primeru gre za primerjavo k-neodvisnih skupin, pri tem pa se povečuje verjetnost napake tipa I, ki sprejema lažno pozitivne rezultate in se povečuje glede na število izvedenih primerjav, pri tem se stopnja zaupanja ($1-\alpha$) za zavrnitev H_0 sorazmerno zmanjšuje. Temu se izognemo tako, da pri analizi k-neodvisnih skupin z Mann-Whitney testom upoštevamo korelacijo vrednosti α s popravkom Boneferroni, ki upošteva število vseh neodvisnih primerjav: $\alpha_{BF} = \alpha / k$ (Bland in Altman, 1995).

4 REZULTATI

V tem poglavju so zbrani rezultati magistrske naloge, ki je bila vpeta v raziskovalni vavčer z naslovom "Vpliv zaporedne uporabe kvasovke spodnjega vrenja na njeno fiziološko stanje pri proizvodnji piva", v obdobju od marca do decembra 2014 na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. Cilj projekta je bil raziskati vpliv reinokulacij na kvasne celice med fermentacijo piva z metabolnega, proteinskega in genomskega vidika. Magistrska naloga se je v tem okviru osredotočila na viabilnost celic med fermentacijo. V tem času smo izvedli 31 zaporednih reinokulacij in po vsaki določali vitalnost in viabilnost kvasovk s štirimi različnimi metodami, poleg tega smo določali še flokulacijske lastnosti kvasovk, karakteristike piva in hitrost fermentacije. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo ovrednotili metode z vidika njihove uporabnosti v pivovarstvu. Pri izvajaju meritev smo uporabili spektrofotometer za določanje OD, metilensko barvanje, mikroskop in program ImageJ za določanje viabilnosti, metodo CFU za določanje kultivabilnosti na YPD petrijevih ploščah in spektrofotometer za merjenje fluorescence komercialnega barvila FUN1 za določanje vitalnosti kvasovk.

4.1 OPTIMIZACIJA METODE DOLOČANJA VITALNOSTI Z UPORABO BARVILA FUN1 (komercialni set Live/Dead, Invitrogen)

Za določanje vitalnosti s komercialnim setom Live/Dead je bilo potrebno najprej določiti primerno koncentracijo barvila FUN1, pri kateri je sprememba razmerja med površino B in površino A optimalna in koncentracija barvila ni prenizka (glej enačbo 7 in 8). Omenjeno optimizacijo smo izvedli tako, da smo enemu delu metabolno aktivnih celic koncentracije 2×10^7 , dodali en del barvila v različnih koncentracijah 60, 30, 15, 7,5 in $1,875 \mu\text{M}$. Končna koncentracija celic je bila 1×10^7 celic/ml, barvila pa 30, 15, 7,5, $1,875$ in $0,9375 \mu\text{M}$. Fluoresenco smo merili s spektrofotometrom v odvisnosti od časa, iz dobljenih podatkov smo nato izračunali površini pod krivuljo A in B, ter njuno razmerje.



Slika 7: Določanje optimalne koncentracije barvila FUN-1

Na zgornji sliki so prikazani rezultati razmerja med površino B in A v odvisnosti od koncentracije barvila FUN-1. Razvidno je, da do večje spremembe razmerja med nepretvorjeno in pretvorjeno obliko barvila FUN1 pride šele pri koncentracijah barvila pod $3.75 \mu\text{M}$. Glede na rezultat pri $1.875 \mu\text{M}$ smo izbrali končno koncentracijo $1.5 \mu\text{M}$ (oz. $3 \mu\text{M}$ pri pripravi barvila, preden se barvilo doda celicam).

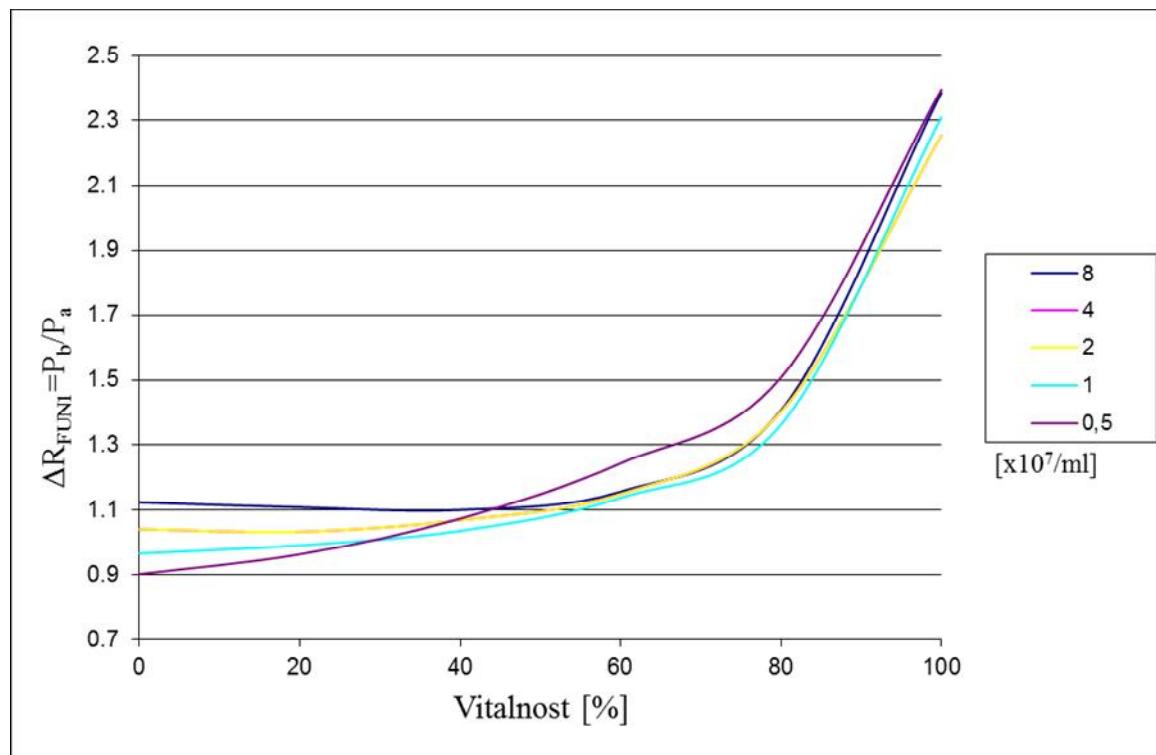
Nato je sledilo določanje optimalne koncentracije kvasnih celic, pri kateri razmerje med površino A in B najbolj optimalno sovpada z živostjo celic. Za izvedbo poskusa smo najprej pripravili suspenzijo živih in mrtvih celic ter nato različne koncentracije celic in razmerja med mrtvimi in živimi celicami, ki so prikazane v spodnji preglednici.

Preglednica 5: Priprava različnih koncentracij in deležev vitalnih kvasnih celic za izdelavo umeritvene krivulje.

Koncentracija celic /ml	Razmerje celic (mrtve : žive)					
$0,5 \times 10^7$	0 : 1	1 : 4	2 : 3	3 : 2	4 : 1	1 : 0
1×10^7	0 : 1	1 : 4	2 : 3	3 : 2	4 : 1	1 : 0
2×10^7	0 : 1	1 : 4	2 : 3	3 : 2	4 : 1	1 : 0
4×10^7	0 : 1	1 : 4	2 : 3	3 : 2	4 : 1	1 : 0
8×10^7	0 : 1	1 : 4	2 : 3	3 : 2	4 : 1	1 : 0

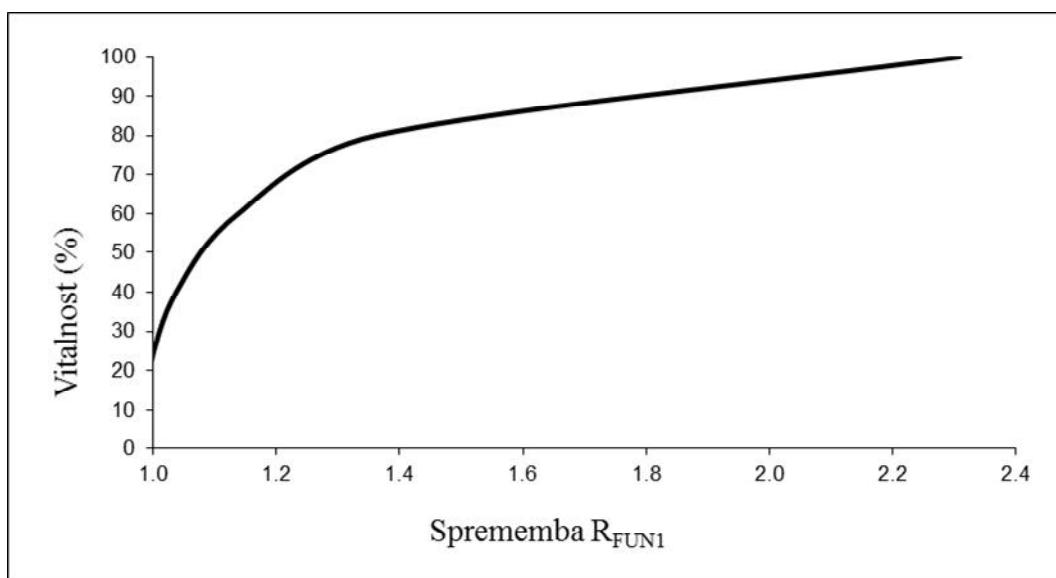
Nato smo merili fluorescenco s spektrofotometrom v odvisnosti od časa, iz dobljenih podatkov smo izračunali površini pod krivuljo A in B, ter njuno razmerje. Rezultati optimizacije koncentracije celic so prikazani na spodnjem grafu, ki prikazuje spremembo

razmerja po 60 minutah v odvisnosti od deleža živih celic v suspenziji. Za najprimernješo koncentracijo smo izbrali 1×10^7 celic/ml, saj poleg koncentracije $0,5 \times 10^7$ celic/ml omogoča merjenje tudi pod 50 % vitalnosti, medtem ko je pri višjih koncentracijah naklon krivulje v tem območju prenizek.



Slika 8: Določanje optimalne koncentracije celic/ml

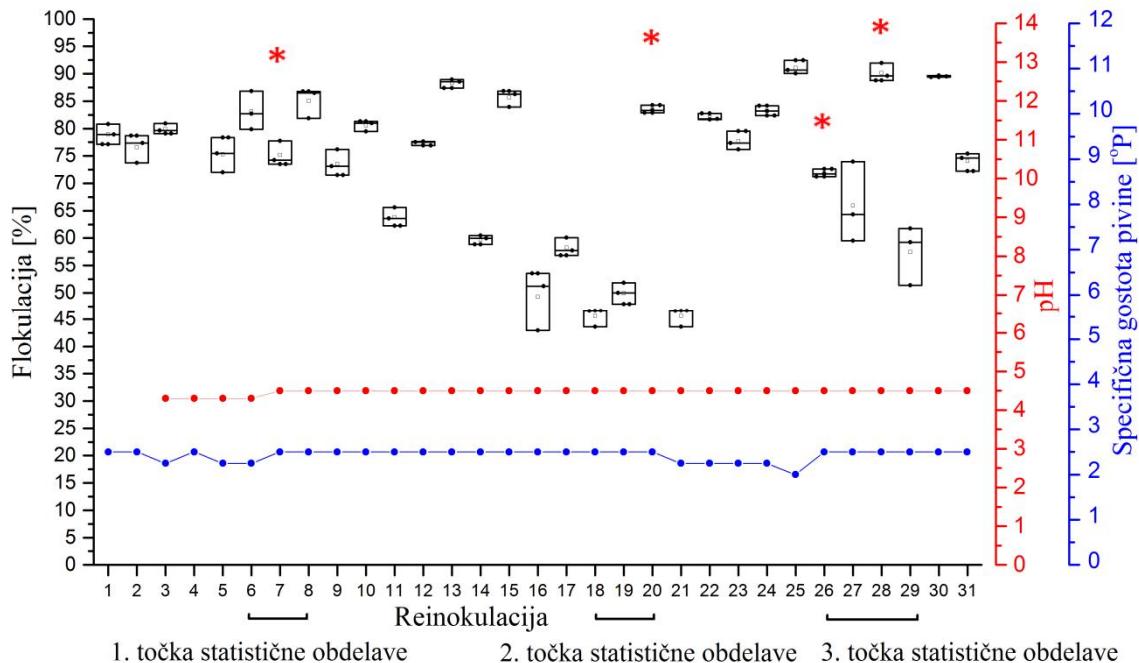
Iz zgoraj zbranih podatkov smo naredili umeritveno krivuljo za metodo določanja viabilnosti kvasovk, ki smo jo izvajali z uporabo komercialnega seta Live/Dead (Invitrogen). Spodnja slika prikazuje odstotek vitalnih celic v odvisnosti od spremembe razmerja po šestdesetih minutah med površino A in B, pri čemer smo uporabili 1×10^7 celic/ml in koncentracijo barvila FUN-1 $3 \mu\text{M}$.



Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje deleža vitalnosti celic z Live/Dead setom

4.2 DOLOČANJE KARAKTERISTIK PIVA PO PRIMARNI FERMENTACIJI

Po končani primarni fermentaciji, ki je trajala en teden, smo pivu določili gostoto, vrednost pH in izvedli modificiran Helmov test, s katerim smo določili stopnjo flokulacije kvasovk. Ker je zaključek fermentacije odvisen od vsebnosti nepovretih sladkorjev v pivu in ker je poraba sladkorjev proporcionalna spremembam gostote piva ter hkrati tudi masi brozge na račun izhajajočega CO₂ in koncentraciji nastalega alkohola (D'Hautcourt in Smart, 1999), smo fermentorje med fermentacijo tehtali in na začetku ter na koncu izmerili relativno gostoto piva s pomočjo hidrometra (slika 10).



Slika 10: Spremljanje stopnje flokulacije, pH ter relativne gostote pivine po 31 zaporednih primarnih fermentacijah piva. Z rdečo zvezdo so označene zaporedne meritve, ki so statistično značilno različne ($p \geq 0,05$) v posamezni točki statistične obdelave.

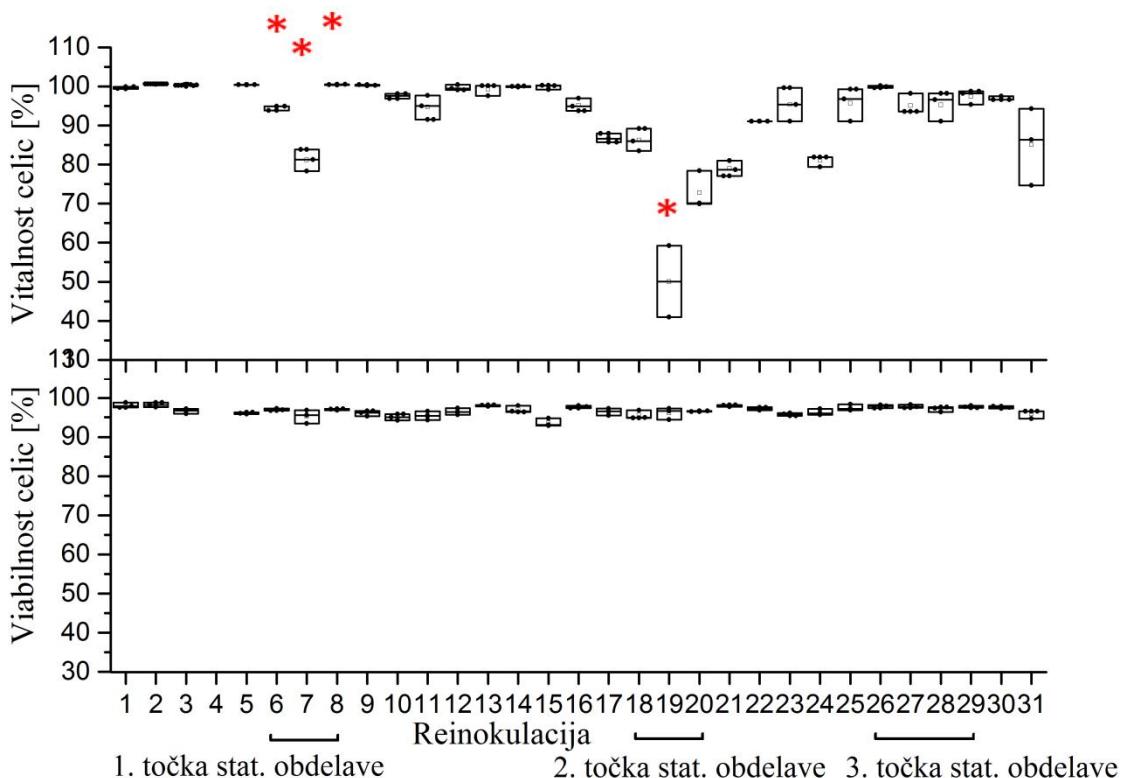
Na grafu 9 so prikazani trije parametri. Prvi parameter nam kaže stopnjo flokulacije kvasne biomase, ki je pomembna ob koncu fermentacije, da lahko ločimo pivo od biomase. Tako dobimo čim bolj čisto pivo, ki je zaželeno v nadaljnjih postopkih, ki sledijo, kot sta filtracija in stekleničenje in sta pomembna za končno kakovost produkta. Podatki flokulacije, prikazani na grafu, nam kažejo, da se stopnja flokulacije skozi ponovne zaporedne fermentacije zelo spreminja in niha med 95 % in 40 %. Iz slike (10) je razvidno, da flokulacija z vsako naslednjo zaporedno uporabo bolj variira. Vzrok za močno variiranje flokulacije je lahko vedno manjša homogenost kulture. Drugi parameter, ki smo ga spremljali, je bil pH. Ta parameter nam potrjuje, da je sam proces fermentacije potekal nemoteno. Iz grafa je razvidno, da je bil v začetnem delu našega eksperimenta pH nekoliko nižji, kot v nadaljevanju zaporednih fermentacij. Razlog za to je lahko pivina, saj smo jo prejeli iz dveh različnih šarž, pH pivine smo merili s pH lističi in je bil med 4,3 in 4,5.

Tretji parameter, ki smo ga spremljali, je bila relativna gostota pivine na koncu fermentacije. Ti podatki nam kažejo, kako dobro so kvasovke pretvorile sladkorje v alkohol. Ta parameter je neposredno povezan z vitalnostjo kvasne biomase in nam v primeru slabše fermentacijske moči pokaže višjo specifično gravitacijo pivine. Skozi celoten eksperiment je bila fermentacijska moč zadostna, da so kvasovke v danem času porabile vse fermentabilne sladkorje, saj je bila relativna gostota skozi celoten eksperiment med 2,5 in 2,25 °P.

4.3 SPREMLJANJE PARAMETROV ŽIVOSTI IN VITALNOSTI

Po koncu vsake zaporedne fermentacije nas je zanimalo fiziološko stanje kvasne biomase. Dva od parametrov, ki smo jih spremljali, sta bila živost in vitalnost kvasne biomase.

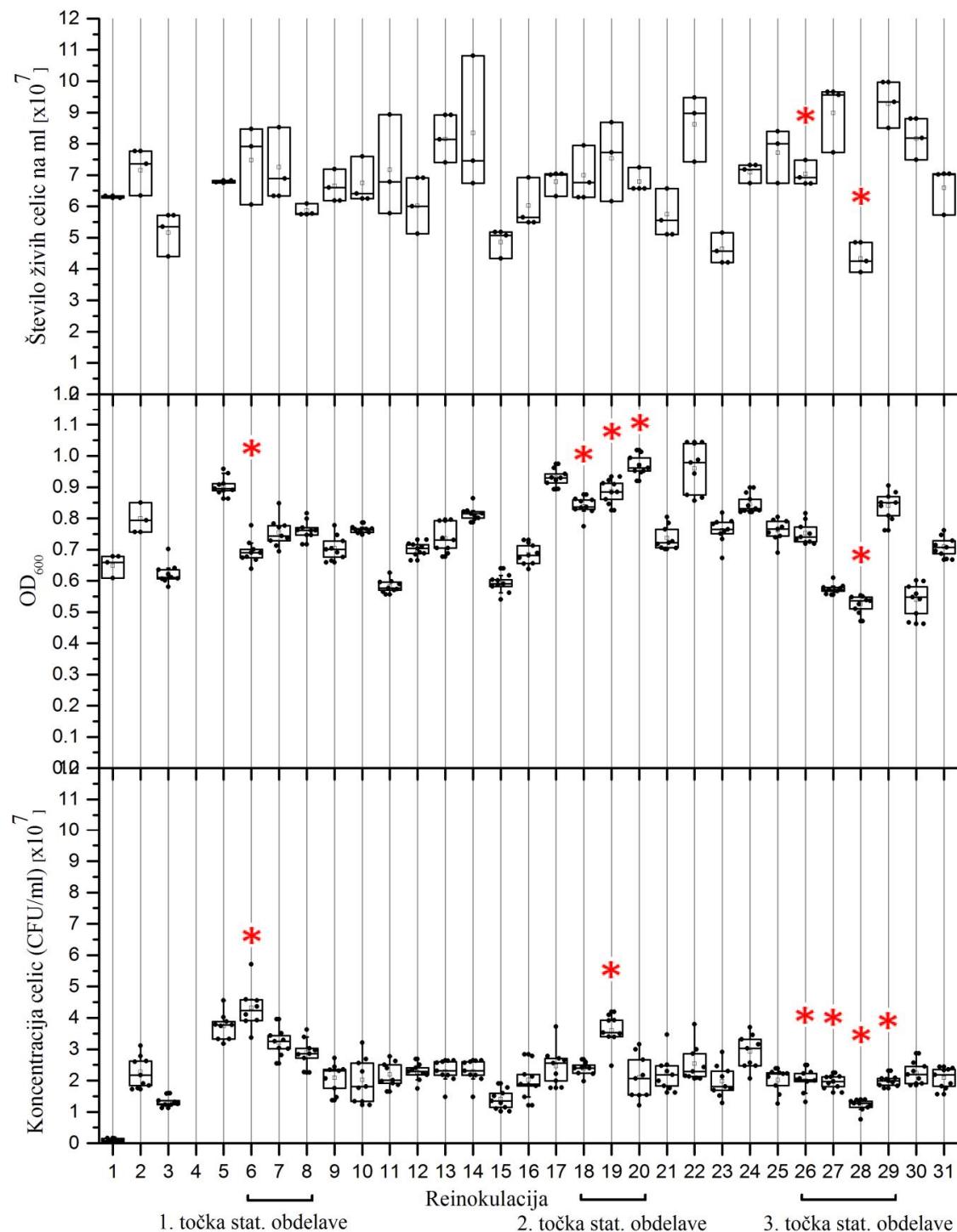
Na spodnjem grafu (slika 11) sta prikazana oba fiziološka parametra - vitalnost in viabilnost kvasne populacije, ki smo jih merili po vsaki ponovni inokulaciji. Vitalnost kvasne populacije je bila prvo polovico poskusa dokaj konstanta z izjemo sedme ponovne inokulacije, ki odstopa od preostalih v prvi polovici poskusa, vitalnost kvasne populacije v prvi polovici, z izjemo sedme ponovne inokulacije, je bila med 90 in 100 % in lepo sovpada z živostjo, ki je bila v prvi polovici prav tako med 90 in 100 %. Večje razlike med živostjo in vitalnostjo so se pokazale v drugi polovici poskusa, predvsem v vitalnosti kvasne populacije, saj je le ta začela nihati med 70 in 100 %, če izvzamemo devetnajsto ponovno inokulacijo, ki močno odstopa od ostalih in je bila med 40 in 60 %. Živost kvasne populacije v drugem delu je bila prav tako med 90 in 100 % in se bistveno ne razlikuje od prvega dela. Kljub temu da je bila vitalnost pri nekaterih ponovnih inokulacijah močno oslabljena, to ni vplivalo na fermentacijsko moč kvasne biomase, saj so kvasovke pri vseh fermentacijah pretvorile zelo podobno količino fermentabilnih sladkorjev. To smo merili s specifično gostoto, kar je razvidno iz slike (10).



Slika 11: Spremljanje vitalnosti in viabilnosti skozi 31 zaporednih primarnih fermentacij. Z rdečo zvezdo so označene zaporedne meritve, ki so statistično značilno različne v posamezni točki statistične obdelave

4.4 SPREMLJANJE PARAMETROV KULTIVABILNOSTI, ŽIVOSTI IN OPTIČNE GOSTOTE

Za merjenje števila živih celic smo, kot v zgornjem primeru, uporabili metodo barvanja z metilenskim modrilm in štetje pod mikroskopom z uporabo računalniškega programa ImageJ. Na spodnjem grafu je za vsako ponovno reinokulacijo prikazano skupno število živih celic, ki smo jih merili en dan po reinokulaciji. Število živih celic se je skozi celoten poskus gibalo znotraj običajnih vrednosti, ki so potrebne za uspešno fermentacijo. V našem primeru so se vrednosti skozi poskus gibale med 4×10^7 in 1×10^8 . Drugi parameter, ki smo ga določali spektrofotometrično z merjenjem optične gostote, je bil število delcev v pivini, ki so jih v našem primeru predstavljale kvasne celice. Skozi eksperiment so se vrednosti optične gostote gibale med 0,5 in 1,1. Omenjene vrednosti lepo sovpadajo z vrednostmi števila živih celic, ki smo jih določali z metodo barvanja z metilenskim modrilm in štetjem pod mikroskopom. Tretji parameter, ki smo ga določali, je bila kultivabilnost kvasovk, vrednosti skozi eksperiment so se gibale med 10^7 in 5×10^7 kultivabilnih celic, omenjene vrednosti ne sovpadajo z vrednostmi števila živih celic in vrednostmi optične gostote. Če vrednosti kultivabilnosti primerjamo z vrednostmi števila živih celic, vidimo, da je kultivabilnost približno trikrat manjša od dejanskega števila celic.



Slika 12: Spremljanje kultivabilnosti kvasovk, optične gostote in živosti kvasovk skozi 31 zaporednih primarnih fermentacij. Z rdečo zvezdo so označene zaporedne meritve, ki so statistično značilno različne v posamezni točki statistične obdelave

4.5 PRIMERJAVA METOD DOLOČANJA ŽIVOSTI IN VITALNOSTI

Namen statistične obdelave podatkov je bil preveriti, ali določene metode pokažejo statistično signifikantne razlike med reinokulacijami, kjer jih druge metode ne. Za primerjavo metod, ki določajo živost (štetje pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ), vitalnost (Live/Dead), kultivabilnost (CFU), število celic (OD) in flokulacijo (Helm), smo na podlagi vizualnih sprememb na grafih omejili na tri točke, znotraj katerih smo primerjali, ali obstajajo signifikantne razlike med zaporednimi reinokulacijami. Prva točka, znotraj katere smo primerjali razlike med skupinami podatkov, je obsegala skupine podatkov iz 6., 7. in 8. reinokulacije, druga točka iz 18., 19., 20. in tretja točka iz 26., 27., 28. in 29. reinokulacije. Izbrane točke so označene na grafih (slika: 8, 9 in 10).

Analiza podatkov po posamezni točki je sledila zaporedju statističnih testov. Za vsako metodo (živost, vitalnost, kultivabilnost, število celic in flokulacijo) smo najprej pogledali ali so skupine podatkov v normalni porazdelitvi (test Shapiro-Wilk) in ali je prisotna homogenost varianc (test Levene). Če so vse reinokulacije znotraj metode bile v normalni porazdelitvi s homogenostjo varianc smo opravili test ANOVA s post-testom Tukey HSD, da smo ugotovili, katere reinokulacije se v posamezni metodi statistično signifikantno razlikujejo med seboj. V primeru, da kakšna skupina podatkov ni ustrezala normalni porazdelitvi ali homogenosti varianc, smo za iskanje signifikantnih razlik opravili test Kruskal-Walis in post-test Mann-Whitney z Bonferronijevo korelacijo.

4.5.1 Statistična primerjava metod določanja na prvi točki

Signifikantne razlike med reinokulacijami v prvi točki (reinokulacije 6, 7 in 8) smo iskali za vsako metodo posebej.

- Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk

S Shapiro-Wilk testom smo preverili, če so posamezne skupine (6,7 in 8) podatkov normalno porazdeljene. Iz rezultatov smo ugotovili, da podatki pri metodi določanja relativne količine živih celic (štetje pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ; % živih) ne ustrezajo normalni razporeditvi. Ostale skupine podatkov ustrezajo normalni razporeditvi (Priloga A).

- Analiza homogenosti varianc z Levene testom

Z Levene testom smo preverili homogenost varianc med skupinami (6,7 in 8). Pri tem smo ugotovili, da so variance skupin pri 95 % stopnji zaupanja med seboj homogene pri vseh metodah (Priloga B).

- Izbira testa za analizo statistično značilnih razlik med skupinami

Pri vseh metodah z izjemo štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ (% živih celic) so podatki normalno razporejeni. Variance skupin so pri 95 % stopnji zaupanja med seboj homogene pri vseh metodah. Pri vseh metodah, ki zadostujejo obema kriterijema, smo izvedli parametrični test ANOVA in Tukey post-test. Pri metodi štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ [% živih] smo izvedli neparametrični test Kruskal-Walis s post-testom Mann-Whitney, ki se uporablja v primeru, če vsaj ena od skupin ni v normalni porazdelitvi, ali če variance med skupinami niso homogene.

- Analiza aritmetične sredine vzorčnih skupin z enosmerno ANOVA in Turkey post-testom

Pri metodi štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ (število živih celic) smo ugotovili, da se skupine med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Pri metodah Helm, Live/Dead, OD in CFU smo ugotovili, da se skupine med seboj statistično razlikujejo (Priloga C).

Post-test Tukey nam je pri metodi Helm med skupinama 7 in 6 pokazal, da se statistično razlikujeta med seboj, prav tako tudi skupini 8 in 7. Skupini 8 in 6 se statistično značilno ne razlikujeta (Priloga C).

Post-test Tukey nam je pri metodi določanja vitalnosti pokazal, da se vse tri skupine med seboj statistično značilno razlikujejo (Priloga C).

Post-test Tukey je pri metodi OD med skupinama 7 in 6 pokazal, da se statistično razlikujeta med seboj, prav tako tudi skupini 8 in 6. Skupini 8 in 7 se ne razlikujeta statistično značilno (Priloga C).

Post-test Tukey je pri metodi CFU med skupinama 7 in 6 pokazal, da se statistično razlikujeta med seboj, prav tako tudi skupini 8 in 6. Skupini 8 in 7 se ne razlikujeta statistično značilno (Priloga C).

Vse statistično značilne razlike so označene z * na grafih (8, 9, 10).

- Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis

S pomočjo omenjenega testa smo ugotovili, da si podatki iz skupin pri metodi štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ (% živih celic) med seboj niso statistično značilno različni (Priloga Č).

4.5.2 Statistična primerjava metod določanja na drugi točki

Enako kot pri prvi točki smo opravili zaporedne statistične analize za podatke v drugi točki (reinokulacije 18, 19 in 20).

- Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk

S Shapiro-Wilk testom smo preverili, če so posamezne skupine (18,19 in 20) podatkov normalno porazdeljene. Iz rezultatov smo ugotovili, da metoda določanja stopnje flokulacije Helm (% flokulacije) ne ustrez normalni razporeditvi. Ostale metode ustrezajo normalni razporeditvi (Priloga D).

- Analiza homogenosti varianc z Levene testom

Z Levene testom smo preverili homogenost varianc med skupinami (18,19 in 20). Pri tem smo ugotovili, da so variance skupin pri 95 % stopnji zaupanja med seboj homogene pri vseh metodah, razen pri metodi določanja kultivabilnosti CFU (Priloga E)

- Izbira testa za analizo statistično značilnih razlik med skupinami

Pri vseh metodah z izjemo določanja flokulacije z metodo Helm so podatki normalno razporejeni. Variance skupin so pri 95 % stopnji zaupanja med seboj homogene pri vseh metodah z izjemo metode določanja kultivabilnosti CFU. Pri vseh metodah, ki zadostujejo obema kriterijema smo izvedli parametrični test ANOVA in v primeru, da so med skupinami statistično značilne razlik še Tukey post-test. Pri metodi določanja flokulacije (Helm) in določanja kultivabilnosti (CFU) smo nadalje izvedli analizo z neparametričnim testom Kruskal-Walis in post-testom Mann-Whitney, ki se uporablja v primeru, če vsaj ena od skupin ni v normalni porazdelitvi, ali če variance med skupinami niso homogene.

- Analiza aritmetične sredine vzorčnih skupin z enosmerno ANOVA in Turkey post-testom

Pri metodah štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ (% živih celic) in (število živih celic) smo ugotovili, da se skupine med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Pri metodah določanja števila delcev OD in določanja vitalnosti s kitom Live/Dead, smo ugotovili, da se vsaj ena skupina statistično značilno razlikuje od preostalih (Priloga F), da bi ugotovili katere skupine se razlikujejo smo v nadaljevanju izvedli še Tukey post-test.

Post-test Tukey nam je pri metodi določanja števila delcev (OD) pokazal, da se vse tri skupine med seboj statistično (Prilog F). Post-test Tukey nam je pri metodi določanja vitalnosti (Live/Dead) pokazal, da se vse tri skupine med seboj statistično značilno razlikujejo (Priloga F).

- Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis

S pomočjo omenjenega testa smo ugotovili, da sta vsaj dve skupini med seboj statistično značilno različni. To velja pri obeh metodah: določanje flokulacije (Helm) in določanje kultivabilnosti (CFU) (Priloga G). Pri tem nismo izvedeli, kateri dve skupini sta to, da bi to izvedeli, smo uporabili še neparametrični post-test Mann-Whitney z Bonferronijevo korelacijo ravni zavrnitev.

Ker smo imeli pri metodi določanja flokulacije (Helm) premalo podatkov, smo ga izvedli samo za metodo določanja kultivabilnosti CFU.

Iz rezultatov Mann-Whitney testov pri metodi CFU smo ugotovili, da se pri izbrani stopnji zavrnitve $\alpha = 0,0125$ med seboj statistično značilno razlikujeta dva para skupin, prvi par sta skupini 18-19 in drugi par 19-120 (Priloga H).

4.5.3 Statistična primerjava metod določanja na tretji točki

Enako kot pri prvih in drugih točkah smo opravili zaporedne statistične analize za podatke še v tretji točki (reinokulacije 26, 27, 28 in 29).

- Analiza normalne porazdelitve s testom Shapiro-Wilk

S Shapiro-Wilk testom smo preverili, če so posamezne skupine (26, 27, 28 in 29) podatkov normalno porazdeljene. Iz rezultatov smo ugotovili, da podatki pri metodi določanja kultivabilnosti CFU in metodi določanja števila delcev ne ustrezajo normalni razporeditvi. Podatki ostalih metoda ustrezajo normalni razporeditvi (Priloga I).

- Analiza homogenosti varianc z Levene testom

Z Levene testom smo preverili homogenost varianc med skupinami (18,19 in 20). Pri tem smo ugotovili, da so variance skupin pri 95 % stopnji zaupanja med seboj homogene pri vseh metodah (Priloga J).

- Izbira testa za analizo statistično značilnih razlik med skupinami

Pri vseh metodah z izjemo, metode določanja kultivabilnosti CFU in metode določanja števila delcev OD, so podatki normalno razporejeni. Variance skupin so pri 95 % stopnji zaupanja med seboj homogene pri vseh metodah.

Pri vseh metodah, ki zadostujejo obema kriterijema smo izvedli parametrični test ANOVA in v primeru da so med skupinami statistično značilne razlik še Tukey post-test. Pri metodi določanja kultivabilnosti (CFU) in določanja števila delcev OD smo nadalje izvedli analizo z neparametričnim testom Kruskal-Walis in post-testom Mann-Whitney, ki se uporablja v

primeru, če vsaj ena od skupin ni v normalni porazdelitvi, ali če variance med skupinami niso homogene.

- Analiza aritmetične sredine vzorčnih skupin z enosmerno ANOVA in Tukey post-testom

Pri metodi štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ (% živih celic) in metodi določanja vitalnosti smo ugotovili, da se skupine med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Pri metodah štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ (število živih celic) in metodi določanja flokulacije (Helm), smo ugotovili, da se skupine med seboj statistično razlikujejo (Priloga K), zato smo v nadaljevanju izvedli še Tukey post-test.

Post-test Tukey nam je pri metodi določanja stopnje flokulacije (Helm) pokazal, da se vse skupine med seboj statistično značilno razlikujejo, razen dveh parov skupin (26-27 in 27-29) (Prilog K).

Post-test Tukey nam je pri metodi štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ (število živih celic) pokazal, da se vse skupine med seboj statistično značilno razlikujejo razen enega para skupin (27-29) (Priloga K).

5) Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis

S pomočjo omenjenega testa smo ugotovili, da sta vsaj dve skupini med seboj statistično značilno različni. To velja pri obeh metodah: določanje flokulacije (Helm) in določanje kultivabilnosti (CFU) (Priloga H). Pri tem nismo izvedeli, kateri dve skupini sta to, da bi to izvedeli, smo uporabili še neparametrični post-test Mann-Whitney z Bonferronijevo korelacijo ravni zavrnitve (Priloga L).

- Analiza statistično značilnih razlik med skupinami s post-testom Mann-Whitney in Bonferronijevo korelacijo

S testom Mann-Whitney smo med seboj posamično primerjali vse štiri skupine. Zaradi večjega števila testov se povečuje verjetnost za sprejetje lažno pozitivnih rezultatov, zato smo upoštevali še Bonferronijevo korelacijo stopnje zavrnitve testa.

Iz rezultatov Mann-Whitney testov pri metodi CFU smo ugotovili, da se pri izbrani stopnji zavrnitve $\alpha = 0,0125$ med seboj statistično značilno razlikuje vseh šest parov skupin (Priloga M).

Iz rezultatov Mann-Whitney testov pri metodi OD smo ugotovili, da se pri izbrani stopnji zavrnitve $\alpha = 0,0125$ med seboj statistično značilno razlikujejo naslednje tri skupine parov: 28-26; 28-27 in 29-28 ostale skupine se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (Priloga M).

5 RAZPRAVA

S. pastorianus je kvasovka, ki se že stoletja uporablja za proizvodnjo lager piva. To je najbolj razširjen stil piva v svetu. V pivovarskem procesu je učinkovitost fermentacije in kakovost končnega produkta zelo pomembna in je neposredno povezana s količino inokuluma in njegovim fiziološkim stanjem. To neposredno vpliva na tvorjenje organskih kislin, estrov, višjih alkoholov, aldehydov in diacetila med fermentacijo ter zorenjem piva in posledično prispeva k celotnim organoleptičnim lastnostim piva. Poleg tega je končni cilj vsake pivovarne proizvajati produkt konstantne visoke kakovosti. To lahko dosežemo le z natančnim nadzorom celotnega procesa v proizvodnji piva. V zadnjih nekaj letih je bilo narejenih veliko izboljšav, ki omogočajo natančno kontrolo ključnih parametrov, kot so oksigeniranost pivine, velikost inokuluma in nadzor temperature pri fermentaciji in shranjevanju. Fiziološko stanje inokuluma kvasovk prav tako vpliva na kvaliteto pobranih kvasovk na koncu fermentacije (Boulton, 1996).

Nekosistentnost fermentacij delno povzroča variabilnost fiziološkega stanja inokuluma. Do te variabilnosti pogosto prihaja zaradi splošne uporabe ponovne zaporedne inokulacije kvasne biomase, kamor spadata tudi pobiranje in shranjevanje kvasne biomase. Pri pivovarskih pogojih je živost kvasa zelo subtilna, kar otežuje presojo kakovosti kvasne biomase (Imai in Ohno, 1999). Z namenom izboljšanja ravnanja s kvasno biomaso in posledično produkcijo bolj konsistentnega in kvalitetnega piva je bilo razvitih več natančnejših metod za določanje kvalitete kvasne biomase. Navadno se v pivovarstvu rutinsko uporablja izraz živost, ki določa odstotek živih celic v populaciji, saj so žive celice ključnega pomena za potek fermentacije. Vendar je navadno bolj pomembno, da so celic v dobrem vitalnem ali fiziološkem stanju. Vitalnost je neposredno povezana z mnogimi dejavniki, ki vključujejo temperaturo, fizično ravnanje s kvasno biomaso, shranjevanje, oksigeniranost kvasne biomase in velikost inokuluma, stresne dejavnike, starost celic in genetiko kvasovk (Heggart in sod., 2000).

Razvoj metod določanja živosti kvasovk vključuje metode, ki temeljijo na podvojevanju celic, na barvanju in na merjenju produktov celic, ki so rezultat metabolne aktivnosti (Jones, 1987).

Kompleksnost metod pri merjenju vitalnosti kvasne biomase je neizogibna. Razvito je bilo mnogo metod, ki določajo vitalnost kvasne biomase, ki lahko kažejo na določeno mero fermentacijske zmogljivosti določenega kvasnega seva. Navadno te metode temeljijo na merjenju specifičnih celičnih komponent, ki so kritične za fermentacijsko aktivnost ali določajo metabolno aktivnost, ki je povezana s fermentacijsko stopnjo. Najpomembnejše zahteve pri metodah določanja živosti in vitalnosti so natančnost, enostavnost za izvedbo, ponovljivost in nizki stroški izvedbe metode (Boulton, 1996).

Cilj magistrske naloge je bil na podlagi rezultatov določiti najprimernješo metodo za določanje fiziološkega stanja kvasnih celic v pivovarstvu. Za ta namen smo uporabili pet različnih metod.

5.1 DOLOČANJE FLOKULACIJE

Z metodo določanja flokulacije (Helm), smo preverili spremembe flokulacijskih lastnosti kvasovk po vsaki ponovni zaporedni inokulaciji. Statistična analiza na prvi točki med skupinami, ki jih predstavljajo zaporedne ponovne inokulacije 6,7 in 8 je pokazala, da se dva para skupin med seboj statistično značilno razlikujeta med seboj, pri enem paru skupin pa statistično značilnih razlik ni bilo. Na drugi točki statistične obdelave, kjer smo primerjali skupine 18, 19 in 20 smo ugotovili, da se skupine med seboj statistično značilno razlikujejo. Prav tako smo statistično analizo izvedli na tretji točki, kjer smo primerjali štiri ponovne zaporedne inokulacije (26, 27, 28 in 29) in pri tem ugotovili, da se dva para od šestih statistično značilno ne razlikujeta. Iz rezultatov lahko zaključimo, da se flokulacijske lastnosti kvasovk skozi ponovne zaporedne inokulacije spreminja, poleg tega je bila flokulacija na začetku med reinokulacijami bolj stabilna, kot pri kasnejših ponovnih inokulacijah. Flokulacijska sposobnost tudi po 29 ponovni inokulaciji ni padla v primerjavi s prvimi ponovnimi inokulacijami, kar pomeni da flokulacija ne omejuje števila ponovnih zaporednih inokulacij. Na te spremembe lahko bistveno vplivata temperatura in koncentracija Mg⁺ ionov, ki so nujno potrebni za zlepljanje celic med seboj. Glede na to, da smo skozi celotno fermentacijo uporabljali enako pivino, prav tako pa se je pH med fermentacijami minimalno spremenjal, to ni bistveni razlog za nastale spremembe v flokulacijskih lastnostih kvasnih celic. Bistveno večji vpliv na omenjeno lastnost imajo stresni dejavniki, ki se pojavljajo med in po fermentaciji, kar lahko razberemo tudi iz rezultatov ostalih metod, ki so odraz fiziološkega stanja kvasovk, na katerega neposredno vplivajo stresni dejavniki, ki so opisani zgoraj.

5.2 DOLOČANJE KULTIVABILNOSTI

Določanje kultivabilnosti z metodo CFU, ki se tradicionalno uporablja v pivovarstvu, smo uporabili tudi v našem eksperiment kot eno od metod določanja živosti. Na prvi (6, 7, 8) in drugi (18, 19, 20) točki statistične analize smo ugotovili, da se po ena skupina statistično razlikuje. Na tretji točki statistične analize, kjer smo primerjali štiri zaporedne reinokulacije, to so 26, 27, 28, in 29 smo ugotovili, da se statistično razlikuje vseh šest parov skupin in se vse skupine med seboj statistično značilno razlikujejo. Metoda določanja kultivabilnosti nam kaže, da v prvi in drugi tretjini ni prišlo do takoj velikih sprememb v homogenosti kulture, kot v zadnji tretjini našega eksperimenta. Do takih sprememb pri določanju kultivabilnosti lahko pride, kot posledica stresnih dejavnikov, katerim so kvasne celice izpostavljene tekom fermentacije, saj morajo kvasne celice najprej popraviti poškodbe v celicah, da se lahko replicirajo. Sposobnost replikacije je

odvisna tudi od revitalizacijskega medija, ki je bil v našem primeru pivina, ki se je uporabljala nadalje pri fermentaciji, in časa revitalizacije, ki navadno predstavlja čas med zaporednimi fermentacijami. Veliko vlogo na popravljalne mehanizme ima kisik med revitalizacijo in v prvih urah fermentacije, torej oksigeniranost pivine na začetku fermentacije. Zaradi narave eksperimenta je bil čas izpostavljenosti kisiku v našem primeru med ponovnimi zaporednimi inokulacijami relativno kratek, kar lahko vpliva na kultivabilnost kvasnih celic v populaciji. Primerjava omenjene metode z metodo barvanja z metilenskim modriliom in štetjem pod mikroskopom, kjer smo določali število živih celic nam pokaže, da je kultivabilnost trikrat nižja. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je dve tretjini kvasnih celic nekultivabilna zaradi vpliva stresnih dejavnikov, ki se pojavljajo med in po fermentaciji.

5.3 DOLOČANJE VITALNOSTI

Vitalnost smo določali s komercialnim setom Live/Dead, ki temelji na uporabi barvila FUN1. Statistična analiza na prvi točki, kjer skupine predstavljajo zaporedne ponovne inokulacije 6, 7 in 8 je pokazala, da se vse tri skupine med seboj statistično razlikujejo. Prav tako smo na drugi točki statistične analize, kjer skupine predstavljajo ponovne reinokulacije 18, 19 in 20 ugotovili, da se vse skupine med seboj statistično razlikujejo. Na tretji točki statistične analize, kjer smo primerjali skupine, ki jih predstavljajo zaporedne inokulacije 26, 27, 28 in 29 smo ugotovili, da med skupinami ni statistično značilnih razlik. Na takšne rezultate verjetno vpliva nehomogenost v populaciji kvasnih celic. Ta je lahko posledica selekcijskega pritiska ali pa celokupne starosti populacije celic. Pri selekcijskem pritisku gre za stresne dejavnike pred, med in po fermentaciji, ki neposredno vplivajo na fiziološko stanje kvasnih celic in dajejo prednost določeni populacije kvasovk. Ta populacija kvasovk se skozi čas povečuje oz. spreminja in to se odraža na zaznanih padcih vitalnosti. Druga možnost, starost populacije, upošteva teorijo, da celice po določenem številu zaporednih ponovnih inokulacij ne morejo več brsteti, ker se njihova membrana zapolni z brazdami. Vitalnost pade na račun večjega deleža starih celic, ki so slabo vitalne, a ob enem ne vidimo nekega usklajenega trenda padca vitalnosti skozi generacije (npr. 29. in 30. sta blizu 100 %), kar nakazuje, da imamo opravka z dinamičnimi heterogenimi populacijami celic. Skozi več ponovnih ciklov se tako spreminja delež starih in mladih celic. V določenih točkah, kjer je vitalnost bila zelo nizka, lahko sklepamo, da je bil delež starih celic večji. Velika verjetnost je, da tako stres kot starost populacije vplivata na njen heterogenost in zaznane spremembe vitalnosti. Na omenjene rezultate lahko vpliva tudi postopek pobiranja kvasne biomase, ker smo morali za nadaljnje ponovne inokulacije pobrati samo srednji sloj biomase, saj iz mikrofermentorjev ni bilo mogoče zelo natančno pobrati samo srednjega sloja biomase, kjer naj bi se nahajale kvasne celice z najvišjo fermentacijsko močjo in posledično najvišjo vitalnostjo.

5.4 DOLOČANJE ŽIVOSTI Z METILENSKIM MODRILOM

Z metodo barvanja z metilenskim barvilom in štetje pod mikroskopom smo določali odstotek živih celic in skupno število živih celic. Pri statistični analizi metode določanja odstotka živih celic smo ugotovili, da na vseh treh točkah ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami. Na podlagi rezultatov lahko ugotovimo, da se odstotek živih celic med zaporednimi reinokulacijami v celotnem eksperimentu ni bistveno spremenjal in se v večini ponovnih reinokulacij nahaja nad 95 % živih celic, kar lepo sovpada z navedbami v literaturi, da je metoda natančna, kadar se viabilnost giba nad 90 % (King in sod., 1981).

Z uporabo metilenskega modrila in štetja pod mikroskopom s pomočjo računalniškega programa ImageJ smo določali število živih celic. Rezultati statistične obdelave na prvi točki, kjer so skupine predstavljale ponovne zaporedne reinokulacije 6, 7 in 8 smo ugotovili, da se skupine med seboj statistično značilno ne razlikujejo. Prav tako smo ugotovili, da se skupine statistično značilno ne razlikujejo na drugi točki statistične analize, kjer skupine predstavljajo ponovne zaporedne reinokulacije 18, 19 in 20. Na tretji točki statistične analize, kjer so skupine predstavljale štiri zaporedne inokulacije (26, 27, 28 in 29) smo ugotovili, da med skupinami obstajajo statistično značilne razlike, razen enega para. Iz rezultatov lahko zaključimo, da je bila v prvi in drugi tretjini homogenost v populaciji kvasovk relativno konstantna, v zadnji tretjini pa se je variabilnost nekoliko povečala, kar lahko neposredno vpliva na končno koncentracijo celic v pivini. K povečanju nehomogenosti prispevajo, kot smo že omenili pri metodi določanja vitalnosti, stresni dejavniki, ki nastanejo pred, med in po fermentaciji in ustvarjajo selekcjski pritisk v populaciji kvasnih celic ter celokupna starost populacije.

5.5 DOLOČANJE ŽIVOSTI Z MERJENJEM OPTIČNE GOSTOTE

Z merjenjem optične gostote smo na prvi točki statistične analize, kjer skupine predstavljajo zaporedne reinokulacije 6, 7 in 8 ugotovili, da se dva para skupin med seboj statistično značilno razlikujeta, en par skupin pa se med seboj statistično značilno ne razlikuje. Na drugi točki statistične analize, kjer skupine predstavljajo ponovne zaporedne inokulacije 18, 19 in 20 smo ugotovili, da se vsi trije pari skupin razlikujejo med seboj. Statistična analiza na tretji točki, kjer so skupine predstavljale štiri zaporedne reinokulacije (26, 27, 28 in 29) smo ugotovili, se trije pari skupin statistično značilno razlikujejo, ostali trije pa ne. Iz rezultatov statistične analize lahko povzamemo, da je prišlo do večjih razlik med skupinami pri slednji metodi v primerjavi z zgornjo metodo (metilensko modrilo), ki prav tako določa število celic, le da presteje le žive. Metoda določanja optične gostote je v primerjavi z metodo štetja pod mikroskopom veliko bolj enostavna in robustna, saj poleg celic meri še ostanke gojišč, delce celičnih sten in druge prisotne, zato je ta metoda primernejša za določanje rutinskih analiz, kjer nas zanima približna ocena in ne rabimo zelo točnih in zanesljivih rezultatov.

5.6 PRIMERJAVA METOD

Primerjava statističnih analiz metod je pokazala, da so statistično značilne razlike med ponovnimi inokulacijami pri vseh metodah. Vendar pa statistično značilne razlike pri posameznih metodah niso vedno pri istih ponovnih inokulacijah in se razlikujejo med metodami. Najmanj statistično značilnih razlik med ponovnimi inokulacijami glede na izbrane točke se je pokazalo pri metodi barvanja z metilenskim modrilm in štetjem pod mikroskopom. Pri tej metodi smo opazili tudi relativno veliko variabilnost med meritvami skozi vse ponovne inokulacije. Temu verjetno botruje prenizko število meritev, da bi lahko zajeli realno distribucijo v populaciji pri posamezni ponovni inokulaciji, kar posledično vpliva na manj statistično značilnih razlik. Za zmanjšanje variabilnosti te metode, bi morali opraviti več meritev za posamezno ponovno inokulacijo, kar bi vplivalo tudi na kvalitetnejšo in bolj relevantno statistično sliko. To velja tudi za metodi določanja vitalnosti in stopnje flokulacije. Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo narediti konkretnih zaključkov, katera metoda je primernejša za uporabo v pivovarstvu, temveč je potrebno pogledati širšo sliko.

En način je opazovanje in primerjava korelacij trendov posameznih metod med seboj. Zaradi nizkega števila meritev je ta trend nekoliko težje opazovati, vendar v veliki meri padanje in rast glede na predhodno ponovno inokulacijo števila živih celic sledi metodi določanju kultivabilnosti ter malo slabše, a še vedno v zadostni meri, izmerjeni optični gostoti. Prednost metode določanja kultivabilnosti je, da poleg določanja kultivabilnih celic omenjena metoda služi kot negativna kontrola in nam pokaže morebitne okužbe do katerih bi lahko prišlo med posameznimi ponovnimi inokulacijami. Slabost omenjene metode je dolg postopek izvedbe metode in dolgotrajno čakanje na rezultate saj je potrebna nekajdnevna inkubacija in rezultate dobimo relativno pozno. V primerjavi z metodo določanja kultivabilnosti je metoda določanja optične gostote izredno hitra in enostavna metoda, vendar pri omenjeni metodi ne merimo samo živih celi, ampak tudi druge delce ki so prisotni v mediju, kot so ostanki celičnih sten in organski delci prisotni v pivini, kar pomeni da na rezultate vpliva veliko dejavnikov. Poleg tega pri omenjeni metodi ne vidimo celic, približno število živih celic lahko dobimo relativno preprosto z izdelavo umeritvenih krivulj, ki pa so žal točne le takrat, ko se velikost celic ne spreminja. Omenjeno metodo priporočamo kot najbolj robustno in enostavno za rutinsko spremljanje fermentacij ob ustreznih implementacijih in dobrim sistemom za štetje pod mikroskopom, saj tako nudi nekoliko več informacij. V takem primeru za spremljanje okužb ne potrebujemo metode določanja kultivabilnosti, temveč samo eno petrijevko, ki služi kot negativna kontrola.

Če primerjamo metodo določanja vitalnosti s stopnjo flokulacije, optično gostoto, kultivabilnostjo ter številom živih celic prvič zabeležimo konkreten padec vitalnih celic gledano na celotno sliko pri sedmi ponovni inokulaciji, prav tako opazimo majhen padec pri stopnji flokulacije glede na predhodno in naslednjo flokulacijo, če pogledamo celotno sliko ne opazimo signifikantne razlike v stopnji flokulacije pri sedmi ponovni inokulaciji.

Pri metodah določanja živosti in optične gostote rezultati ne odstopajo od celotne slike, je pa zanimivo, da je šesta ponovna inokulacija signifikantno različna od preostalih skupin znotraj točke. Tukaj si lahko postavimo vprašanje, če lahko tak trend narekuje zabeležen padec vitalnosti v naslednji, 7. ponovni inokulaciji. Za odgovor na tako vprašanje imamo v našem primeru na žalost veliko premalo podatkov. Je pa zanimivost, ki bi jo bilo vredno preučiti v prihodnjih raziskavah.

Naslednja zanimiva točka je devetnajsta ponovna inokulacija, kjer opazimo močan padec vitalnosti. Pri tem je zanimivo, da se postopen padec začne že pri 16. ponovni reinokulaciji in pada vse do 19. kjer tudi doseže dno, nato se začne počasi dvigovati, vendar se nikoli v celoti ne opomore. Pri tem je vse do 31. ponovne inokulacije večja variabilnost znotraj ene ponovne inokulacije. Podoben trend padca smo opazili tudi pri določanju stopnje flokulacije, kjer dno prav tako doseže okoli 19. ponovne inokulacije, ter je pri tem povečana stopnja variabilnosti vse do konca eksperimenta. Tega pa ne moremo reči za metode merjenja živosti in optične gostote, kjer prav tako prihaja do vzponov in padcev, vendar trend ni tako izrazit. Pri tem je zanimivo, da sta živost in optična gostota najvišji ravno pri 19. ponovni inokulacij, kar je ravno obratno kot pri metodah določanja flokulacije in vitalnosti. Ali je to naključje ali pa ima pri tem mogoče kakšno povezavo starost populacije ne vemo, vendar bi bilo vredno v prihodnih raziskavah to bolj natančno preučiti. Kar lahko razberemo iz take primerjave, je to, da je merjenje flokulacije in vitalnosti smiselno, saj dobimo več koristnih informacij, ki so kontradiktorne splošni intuiciji iz opazovanja števila živih celic, optične gostote in štetja kolonij. Katera metoda je bolj smiselna, je odvisno od parametrov, ki nas zanimajo in same izvedbe metode. Za rutinsko preverjanje poteka fermentacije je smiselno uporabiti metodo merjenja optične gostote, saj je metoda enostavna in hitra, vendar dobimo okvirne rezultate, ki niso najbolj zanesljivi. Če bi radi dobili zanesljive in relativno hitre rezultate je najprimernejša metoda določanja živih celic z metodo barvanja z metilenskim modrilom. V primeru ko opazimo senzorične spremembe ali neobičajen čas fermentacije je smiselno preveriti vitalnost kvasne biomase. V primeru ko imamo težave na koncu fermentacije, pa je smiselno preveriti flokulativnost kvasne biomase. Najbolj zanesljive rezultate dobimo, če parametre živosti in vitalnosti preverimo z več različnimi metodami, saj tako dobimo najbolj objektivno sliko.

6 SKLEPI

- 20 reinokulacij ne vpliva na živost kvasnega inokuluma, to nam pokaže metoda barvanja z metilenskim modrilom in štetje pod mikroskopom s pomočjo računalniškega programa ImageJ.
- Tradicionalna metoda določanja živosti kvasovk z metilenskim modrilom je ustrezna za pivovarstvo, saj nam poda dovolj informacij, na podlagi katerih lahko pripravimo inokulum za uspešen potek fermentacij.
- Med posameznimi metodami določanja živosti in kondicije obstaja korelacija, vendar to ne velja za vse metode.

7 POVZETEK

V okviru magistrske naloge smo izvedli 31 ponovnih zaporednih inokulacij s kvasovko *S. pastorianus* ZIM 2203 v laboratorijskem merilu, pri čemer smo posnemali industrijske razmere. Za ta namen smo izdelali mikro-fermentacijski sistem, ki posnema industrijske razmere, kot sta temperatura in čas fermentacije, hidrostatski tlak, parcialni tlak CO₂ v fermentorju in razpršenost biomase v mediju.

Za prvo fermentacijo smo namnožili kvasno biomaso, ki smo jo uporabili za prvo fermentacijo, pri vseh nadaljnjih fermentacijah smo z delom biomase iz predhodne fermentacije inokulirali naslednjo fermentacijo, to smo ponovili enaintridesetkrat. Po vsaki inokulaciji smo po približno 24 urah preverili fiziološke parametre kvasne biomase s petimi različnimi metodami, ki se za ta namen uporablajo v pivovarstvu. Metode, ki smo jih uporabili za spremljanje flokulacije, živosti, števila in vitalnosti niso nadomestljive in ne določajo istih lastnosti celice. Metoda določanja stopnje flokulacije je pokazala, da se znotraj točk statistične analize posamezne skupine statistično razlikujejo.

Analiza pokaže, da je bila flokulacija v začetnem delu bolj stabilna v primerjavi s kasnejšimi reinokulacijami, vendar to ne omejuje števila reinokulacij, saj stopnja flokulacije ni padla v primerjavi s prvimi reinokulacijami.

Pri metodi določanja kultivabilnosti na trdnem gojišču se je pokazalo, da v prvi in drugi tretjini ni prišlo do tako velikih sprememb v homogenosti kulture kot v zadnji tretjini našega eksperimenta. Do sprememb v kultivabilnosti pride tudi zaradi kopiranja stresnih dejavnikov skozi ponovne inokulacije, ki posledično vpliva na nehomogenost v kulturi.

Pri metodi določanja vitalnosti s komercialnim setom Live/Dead smo ugotovili, da se na prvi in drugi točki statistične obdelave vse skupine med seboj statistično razlikujejo, na tretji točki pa med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik. Na dobljene rezultate te metode lahko vpliva pobiranje biomase in nehomogenost v kulturi zaradi selekcijskega pritiska, ki ga ustvarjajo stresni dejavniki.

Z metodo barvanja z metilenskim modrilom in štetjem pod mikroskopom s pomočjo računalniškega programa ImageJ smo določali odstotek in število živih celic. V primeru, ko smo statistično analizirali odstotek živih celic v populaciji, smo ugotovili da na nobeni točki med skupinami ni statistično značilnih razlik, kar pomeni da je bil odstotek živih celic skozi celoten poskus konstanten in stresni dejavniki skozi ponovne reinokulacije minimalno vplivajo na odstotek živih celic.

V primeru, ko smo določali število živih celic na prvi in drugi točki statistične analize, ni bilo statistično značilnih razlik, med skupinami na tretji točki pa sta se dve skupini statistično razlikovali, kar nam pokaže tako kot pri metodi določanja kultivabilnosti, da je

v zadnjem delu poskusa prišlo do večje nehomogenosti v populaciji zaradi vpliva stresnih dejavnikov.

Pri metodi, kjer smo določali optično gostoto, je statistična analiza na prvi in tretji točki pokazala, da se po ena skupina razlikuje, na drugi točki se vse skupine razlikujejo znotraj točke, takšni rezultati so lahko posledica nenatančnosti metode, saj je metoda zelo preprosta, poleg tega ima velik vpliv na rezultat velikost celic. Metodo merjenja optične gostote lahko nadomestimo z metodo določanja števila celic z barvanja z metilenskim modriliom, saj rezultati obeh metod lepo sovpadajo. Prav tako se statistični rezultati omenjene metode lepo ujemajo z metodo določanja kultivabilnosti.

- Aeschbacher M., Reinhardt C.A., Zbinden G. 1986. A rapid cell membrane permeability test using fluorescent dyes and flow cytometry. *Cell Biology Toxicology*, 2, 2: 247-55
- Aguilera J., Randez-Gil F., Prieto J.A. 2007. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 3: 327-341
- Anséhn S., Nilsson L. 1984. Direct membrane-damaging effect of ketoconazole and tioconazole on *Candida albicans* demonstrated by bioluminescent assay of ATP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26, 1: 22-25
- 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
- Aries V., Kirsop B.H. 1977. Sterol synthesis in relation to growth and fermentation by brewing yeasts inoculated at different concentrations. *Journal of the Institute of Brewing*, 83, 4: 220-223
- Barnett J.A. 2000. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880. *Yeast*, 16, 8: 755-771
- Barnett J.A., Lichtenthaler F.W. 2001. A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880–1900. *Yeast*, 18, 4: 363-388
- Bland J.M., Altman D.G. 1995. Multiple significance tests - the Bonferroni method. *British Medical Journal*, 310, 6973: 170-170
- Blieck L., Toye G., Dumortier F., Verstrepen K.J., Delvaux F.R., Thevelein J.M., Van Dijck P. 2007. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3: 815-24
- Bochner B.S., McKelvey A.A., Schleimer R.P., Hildreth J.E., MacGlashan D.W., Jr. 1989. Flow cytometric methods for the analysis of human basophil surface antigens and viability. *Journal of Immunological Methods*, 125, 1-2: 265-71
- Boulton C.A. 1991. Developments in brewery fermentation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 9: 127-81
- Boulton C.A. 1996. A critical assessment of yeast vitality testing. *Ferment*, 9, 4: 222-226
- Breeuwer P., Drocourt J.L., Bunschoten N., Zwietering M.H., Rombouts F.M., Abbe T. 1995. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 4: 1614-9
- Briggs D., Boulton C., Brookes P., Stevens R. 2004. *Brewing science and practice*. Cambridge, Woodhead Publishing: 881 str.
- Brown M.B., Forsythe A.B. 1974. Robust tests for equality of variances. *Journal of the American Statistical Association*, 69, 346: 346-367
- Bühligen F., Lindner P., Fetzer I., Stahl F., Scheper T., Harms H., Müller S. 2014. Analysis of aging in lager brewing yeast during serial repitching. *Journal of Biotechnology*, 187: 60-70
- Boulton C., Quain D. 2001. *Brewing yeast and fermentation*. Oxford, UK, Blackwell Science: 19-142

- Cabiscol E., Piulats E., Echave P., Herrero E., Ros J. 2000. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, 275, 35: 27393-27398
- Casey G.P., Magnus C.A., Ingledew W.M. 1984. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. Applied and Environmental Microbiology, 48, 3: 639-646
- Casey G.P., Ingledew W.M. 1986. Ethanol tolerance in yeasts. Critical Reviews in Microbiology, 13, 3: 219-80
- Commoner B., Townsend J., Pake G.E. 1954. Free radicals in biological materials. Nature, 174, 4432: 689-91
- 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
- Costa V., Reis E., Quintanilha A., Moradasferreira P. 1993. Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 300, 2: 608-614
- Csonka L.N., Hanson A.D. 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. Annual Review of Microbiology, 45: 569-606
- Czekanska E.M. 2011. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. Methods in Molecular Biology, 740: 27-32
- D'Amore T., Panchal C., Russeil I., Stewart G. 1988. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. Journal of Industrial Microbiology, 2, 6: 365-372
- D'Amore T., Russell I., Stewart G.G. 1989. The effect of carbohydrate adjuncts on brewer's wort fermentation by *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis)*. Journal of the Institute of Brewing, 95, 5: 333-336
- D'Hautcourt O., Smart K.A. 1999. Measurement of brewing yeast flocculation. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 57: 123-128
- Deere D., Shenjian S., Vesey G., Bell P., Bissinger P., Veal D. 1998. Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. Yeast, 14: 147-160
- Demain A.L., Phaff H.J., Kurtzman C.P. 1998. The industrial and agricultural significance of yeasts. V: The yeast, a taxonomic study. 4th ed. Kurtzman C. P., Fell J. W. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 13-19
- Dihazi H., Kessler R., Eschrich K. 2001. Phosphorylation and inactivation of yeast 6-phosphofructo-2-kinase contribute to the regulation of glycolysis under hypotonic stress. Biochemistry, 40, 48: 14669-14678
- Dihazi H., Kessler R., Eschrich K. 2004. High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. Journal of Biological Chemistry, 279, 23: 23961-23968
- Drost B.W. 1977. Fermentation and storage. V: Proceedings of the 16th Congress of the European Brewing Convention, Amsterdam, 1977. Rotterdam, European Brewery Convention: 519-532
- Essary B.D., Marshall P.A. 2009. Assessment of FUN-1 vital dye staining: Yeast with a block in the vacuolar sorting pathway have impaired ability to form CIVS when stained with FUN-1 fluorescent dye. Journal of Microbiological Methods, 78, 2: 208-212

- Evans P., Halliwell B. 1999. Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 884, 1: 19-40
- Gasch A.P. 2003. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S, Mager W. H. (eds.). Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 11-70
- Gibson B.R., Lawrence S.J., Leclaire J.P., Powell C.D., Smart K.A. 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 5: 535-569
- Gibson B.R., Lawrence S.J., Boulton C.A., Box W.G., Graham N.S., Linforth R.S., Smart K.A. 2008. The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8, 4: 574-85
- Gibson B.R., Storgårds E., Krogerus K., Vidgren V. 2013. Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Frohberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast*, 30, 7: 255-266
- Girotti A.W. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 39, 8: 1529-42
- Gounot A.M., Russell N.J. 1999. Physiology of cold-adapted microorganisms. V: *Cold-adapted organisms*. Margesin R., Schinner F. (eds.). Berlin, Springer Heidelberg: 33-55
- Hammond J.R.M. 1993. 2 - Brewer's yeasts. V: *The Yeasts*. Vol 5. Yeast technology 2nd ed. Rose. A. H., Harrison J.S., (eds.). San Diego, Academic Press: 7-67
- 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
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journals of Gerontology*, 11,3: 298-300
- Harman D. 1980. Free radical theory of aging: Origin of life, evolution, and aging. *Journal of the American Aging Association*, 3, 4: 100-102
- Heggart H., Margaritis A., Stewart R.J., Pilkington H., Sobczak J., Russell I. 2000. Measurment of brewing yeast viability and vitality: A review of methods. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 37, 4: 409-430
- Heggart H.M., Margaritis A., Pilkington H., Stewart R.J., Dowhanick T.M., Russell I. 1999. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *Technical quarterly - Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 36, 4: 383-406
- Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 2: 300-72
- Homan M.M. 2004. Beer and its drinkers: an ancient Near Eastern love story. *Near Eastern Archaeology*, 67, 2: 84-95
- Hulse G.A. 2010. Yeast propagation. V: *Brewing yeast fermentation performance*. 2nd ed. Smart K. (ed.). Oxford, Wiley-Blackwell Science: 249-256
- Imai T., Ohno T. 1995. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 10: 3604-3608
- Imai T., Ohno T. 1999. The assessment of yeast vitality - the past and the future. *Brewers Guardian*, 128, 6: 20-37

- Jamieson D.J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 14, 16: 1511-1527
- Jones E.W. 1991. Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 266, 13: 7963-7966
- Jones R.P. 1987. Mesurment of yeast death and deactivation and deactivation and their meaning: Part I. Process Biochemistry, 22: 118-125
- Kim J., Alizadeh P., Harding T., Hefner-Gravink A., Klionsky D.J. 1996. Disruption of the yeast ATH1 gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. Applied and Environmental Microbiology, 62, 5: 1563-1569
- King L.M., Schisler O.D., Ruocco J.J. 1981. Epifluorescent metod for detection of nonviable yeast. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 39: 52-54
- Klipp E., Nordlander B., Kruger R., Gennemark P., Hohmann S. 2005. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. Nature Biotechnology, 23, 8: 975-982
- Knatchbull F.B., Slaughter J.C. 1987. The effect of low CO₂ pressures on the absorption of amino acids and production of flavour-active volatiles by yeast. Journal of the Institute of Brewing, 93, 5: 420-424
- Kobayashi M., Shimizu H., Shioya S. 2007. Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering, 103, 5: 451-456
- Kordialik-Bogacka E., Diowksz A. 2013. Physiological state of reused brewing yeast. Czech Journal of Food Sciences, 31: 264-269
- Kuhn D.M., Balkis M., Chandra J., Mukherjee P.K., Ghannoum M.A. 2003. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. Journal of Clinical Microbiology, 41, 1: 506-508
- Kwolek-Mirek M., Zadrag-Tecza R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. FEMS Yeast Research, 14, 7: 1068-1079
- 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
- Lam M.H.Y., Snider J., Rehal M., Wong V., Aboualizadeh F., Drecun L., Wong O., Jubran B., Li M., Ali M., Jessulat M., Deineko V., Miller R., Lee M.e., Park H.-O., Davidson A., Babu M., Stagljar I. 2015. A comprehensive membrane interactome mapping of Sholp reveals Fps1p as a novel key player in the regulation of the HOG pathway in *S. cerevisiae*. Journal of Molecular Biology, 427, 11: 2088-2103
- Lense K. 1996. Katechismus der Brauerei-Praxis. Neu bearbeitete 16th Aufl. Schlecht E. (ed.) Nürnberg, Hans Carl: 416 str.
- Lentini A., Rogers P., Higgins V., Dawes I., Chandler M., Stanley G., Chambers P. 2008. The impact of ethanol stress on yeast physiology. V: Brewing yeast fermentation performance. 2nd ed. Smart K. (ed.). Oxford, Blackwell Science: 23-38
- Levitz S.M., Diamond R.D. 1985. A rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. Journal of Infectious Diseases, 152, 5: 938-945
- Libkind D., Hittinger C.T., Valério E., Gonçalves C., Dover J., Johnston M., Gonçalves P., Sampaio J.P. 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 35: 14539-14544

- Lima L., Brandão T., Lima N., Teixeira J.A. 2011. Comparing the impact of environmental factors during very high gravity brewing fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 117, 3: 359-367
- López-Amorós R., Comas J., Vives-Rego J. 1995. Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* starvation-survival in seawater using rhodamine 123, propidium iodide, and oxonol. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 7: 2521-6
- Ludovico P., Sansonetty F., Corte-Real M. 2001. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. *Microbiology*, 147, Pt 12: 3335-43
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 1997. *Brock biology of microorganisms*. 8th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall: 986 str.
- Mann H.B., Whitney D.R. 1947. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Institute of Mathematical Statistics*, 18, 1: 50-60
- Marchi E., Cavalieri D. 2008. Yeast as a model to investigate the mitochondrial role in adaptation to dietary fat and calorie surplus. *Genes and Nutrition*, 3, 3-4: 159-66
- McGahon A.J., Martin S.J., Bissonnette R.P., Mahboubi A., Shi Y., Mogil R.J., Nishioka W.K., Green D.R. 1995. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods in Cell Biology*, 46: 153-85
- Millard P.J., Roth B.L., Thi H.P., Yue S.T., Haugland R.P. 1997. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 7: 2897-905
- Minois N., Frajnt M., Wilson C., Vaupel J.W. 2005. Advances in measuring lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 2: 402-406
- 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
- Molecular Probes. 2001. Probes for yeast viability. Eugene, Molecular Probes: 6 str.
<http://tools.termofisher.com/content/sfs/manuals/mp07009.pdf> (september 2016)
- Morris G.J., Winters L., Coulson G.E., Clarke K.J. 1986. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 132, 7: 2023-34
- Myers J.A., Curtis B.S., Curtis W.R. 2013. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BioMed Central Biophysics*, 6, 4, doi: 10.1186/2046-1682-6-4: 15 str.
- Nikolova M., Savova I., Marinov M. 2002. An optimised method for investigation of the yeast viability by means of fluorescent microscopy. *Journal of Culture Collections*, 3,1: 66-71
- O'Connor-Cox E. 1998. Improving yeast handling in the brewery, Part 2: Yeast collection, *Brewers Guardian*, 122: 22-34
- Odumeru J., D'Amore T., Russell I., Stewart G. 1992. Effects of heat shock and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. *Journal of Industrial Microbiology*, 10, 2: 111-116
- Olkin I. 1960. Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling. Stanford, Stanford University Press: 517 str.

- Painting K., Kirsop B. 1990. A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6, 3: 346-7
- 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: 374-8
- Patel G.B., Ingledew W.M. 1973. Internal carbohydrates of *Saccharomyces carlsbergensis* during commercial lager brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 79, 5: 392-396
- Patel G.B., Ingledew W.M. 1973. Trends in wort carbohydrate utilization. *Journal of Applied Microbiology*, 26, 3: 349-353
- Petrov V.V., Okorokov L.A. 1990. Increase of anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. *Yeast*, 6, 4: 311-318
- Phadtare S., Alsina J., Inouye M. 1999. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 2: 175-180
- Piper P.W. 1993. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 11, 4: 339-355
- 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: 149-57
- Powell C.D., Diacetis A.N. 2007. Long term serial repitching and the genetic and phenotypic stability of brewer's yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 113, 1: 67-74
- Pratt P.L., Bryce J.H., Stewart G.G. 2003. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *Journal of the Institute of Brewing*, 109, 3: 218-228
- 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
- Rank G.H., Casey G., Xiao W. 1988. Gene transfer in industrial *Saccharomyces* yeasts. *Food Biotechnology*, 2, 1: 1-41
- Reiser V., Raitt D.C., Saito H. 2003. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of Cell Biology*, 161, 6: 1035-1040
- Rep M., Proft M., Remize F., Tamás M., Serrano R., Thevelein J.M., Hohmann S. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Molecular Microbiology*, 40, 5: 1067-1083
- Ribeiro G.F., Côrte-Real M., Johansson B. 2006. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 10: 4584-4591
- Rowe S.M., Simpson W.J., Hammond J.R.M. 1994. Intracellular pH of yeast during brewery fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 18, 3: 135-137
- Russell N.J. 1989. Adaptive modifications in membranes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21, 1: 93-113

- Sato M., Watari J., Shinotsuka K. 2001. Genetic instability in flocculation of bottom-fermenting yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 59: 130–134
- Schade B., Jansen G., Whiteway M., Entian K.D., Thomas D.Y. 2004. Cold adaptation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 12: 5492-502
- Serrano R., Kielland-Brandt M.C., Fink G.R. 1986. Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$), K^+ - and Ca^{2+} -ATPases. *Nature*, 319, 6055: 689-693
- Shapiro S.S., Wilk M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52: 591–611
- Shinitzky M. 1984. Membrane fluidity and receptor function. V: Membrane fluidity. Kates M., Manson L. (eds.). New York, Springer: 585-601
- Sieuwerts S., De Bok F.A.M., Mols E., De Vos W.M., Van Hylckama Vlieg J.E.T. 2008. A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 4: 275-278
- Smart K.A., Whisker S. 1996. Effect of serial repitching on the fermentation properties and condition of brewing yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 54, 1: 41-44
- Smart K.A., Lawrence S., Leclaire J., Davy S. 2006. Brewing yeast flocculation: A model for onset and control. *Proceedings of the Institute of Brewing District Asia Pacific Conference Hobart*. Cd-rom: 16 str.
- Stewart G.G. 2001. Yeast Management - The balance between fermentation efficiency and beer quality. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*, 38: 47-53
- Tamás M., Hohmann S. 2003. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W. (eds.). Berlin, Springer: 121-200
- Tenge C. 2009. Yeast. V: *Handbook of brewing*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag: 119-145
- Thieringer H.A., Jones P.G., Inouye M. 1998. Cold shock and adaptation. *Bioessays*, 20, 1: 49-57
- Toh T.-H., Kayingo G., van der Merwe M.J., Kilian S.G., Hallsworth J.E., Hohmann S., Prior B.A. 2001. Implications of FPS1 deletion and membrane ergosterol content for glycerol efflux from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 1, 3: 205-211
- Tsukatani T., Higuchi T., Suenaga H., Akao T., Ishiyama M., Ezoe T., Matsumoto K. 2009. Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water-soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. *Analytical Biochemistry*, 393, 1: 117-25
- Vaughan-Martini A., Kurtzman C.P. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces* *Sensu Stricto*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35, 4: 508-511
- Waites M.J., Morgan N.L., Rockey J.S., Higton G. 2001. Industrial microbiology: an introduction. Osney Mead, Oxford, Blackwell Science: 258 str.
- Walker G.M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. West Sussex, John Wiley and Sons: 854 str.
- Walker G.M. 2004. Metals in yeast fermentation processes. V: *Advances in Applied Microbiology*, 55: 197-229

Zupan J., Avbelj M., Butinar B., Kosel J., Sergan M., Raspor P. 2013. Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 10: 2496-2505

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Sonji Smole Možina za strokovni pregled magistrskega dela in prvotnemu mentorju, prof. dr. Petru Rasporju za strokovno pomoč pri postavitevi magistrskega dela.

Še posebno se zahvaljujem somentorju dr. Juretu Zupanu, za strokovno vodstvo in pomoč, ki sem jo potreboval pri izvedbi eksperimentalnega dela magistrske naloge ter pomoč pri zasnovi magistrskega dela in strokovni pregled.

Zahvaljujem se še mlademu raziskovalcu Mihi Tome za nasvete pri pisanju magistrskega dela še posebej statistični del.

Zahvaljujem se tudi vsem na celotni Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, ki so kakorkoli pripomogli k samemu poteku magistrskega dela.

Na koncu gre posebna zahvala še staršem in sestri, ki so me podpirali že od samega začetka študija in mi nudili odlične pogoje za študij.

Priloga A: Analiza normalne porazdelitve s Shapiro-Wilk testom na točki 1

Za vsako skupino smo naredili test Shapiro-Wilk in preverili normalno porazdelitev vzorcev

Test	W	p - vrednost
ImageJ [% živih celic]	0,680	0,00084
ImageJ [število živih celic]	0,838	0,05529
Live/Dead [% viabilnih]	0,852	0,07981
Helm [% flokulacije]	0,900	0,2559
OD [število delcev]	0,988	0,9006
CFU [število kolonij]	0,942	0,1567

Rezultati kažejo, da so podatki iz skupin: ImageJ [število živih celic], Live/Dead [% viabilnih], Helm [% flokulacije], OD [število delcev], CFU [število kolonij] normalno razporejeni. Pri skupinah metod ImageJ [% živih celic] podatki niso normalno razporejeni.

Hipotezo H_0 : vzorci prihajajo iz populacije z normalno porazdelitvijo, lahko zavrnemo v primeru, da je pripadajoča vrednost P manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,05$.

Priloga B: Analiza homogenosti varianc z Levene testom točka 1

Za vsako skupino smo naredili test Levene in preverili homogenost varianc vzorcev, ki je pomembna za primerjavo k-skupin med seboj s parametričnim testom ANOVA

Metoda	F-vrednost	p - vrednost
ImageJ [% živih celic]	2,493	0,162
ImageJ [število živih celic]	0,799	0,492
Live/Dead [% viabilnih]	2,790	0,139
Helm [% flokulacije]	0,133	0,877
OD [število delcev]	0,640	0,535
CFU [število kolonij]	1,674	0,214

Dobljene vrednosti F testa Levene presegajo kritično vrednost F-distribucije s k-1 in N-k prostorskih stopenj, pri izbrani stopnji zaupanja 95 %, pripadajoča vrednost P ni manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,005$. Zato lahko potrdimo hipotezo H_0 : variance skupin so homogene.

Priloga C: Analiza s parametričnim testom ANOVA s Tukey post-testom točka 1

Za metode, ki imajo podatke normalno porazdeljene in so variance med skupinami homogene smo uporabili parametrični test ANOVA s Tukey post-testom. Rezultati analize s parametričnim testom ANOVA. Pri čemer je SS vsota kvadratov odklonov in DF diskriminantna funkcija.

Metoda		DF	SS	Kvadratna vrednost	F-vrednost	Prob>F
ImageJ [število celic]	model	2	4,57E+14	2,29E+14	2,343	0,177
	napaka	6	5,85E+14	9,75E+13		
Live/Dead	model	2	0,05861	0,029303	109,9	0,0000188
	napaka	6	0,0016	0,000267		
Helm	model	2	0,016437	0,008219	9,864	0,0127
	napaka	6	0,004999	0,000833		
CFU	model	2	9,40E+14	4,70E+14	17,02	0,0000291
	napaka	23	6,35E+14	2,76E+13		
OD	model	2	0,02709	0,013545	9,043	0,00118
	napaka	24	0,03595	0,001498		

Rezultati analize s Tukey post-testom.

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
Vitalnost (Live/Dead kit)	7-6	-0,13369812	-0,17460762	0,09278863	0,0001405
	8-6	0,05923085	0,01832136	0,10014035	0,0103633
	8-7	0,19292897	0,15201948	0,23383847	0,0000166

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
Helm	7-6	-0,07969573	-0,15200754	0,007383916	0,0341857
	8-6	0,01893108	-0,05338073	0,091242896	0,7148602
	8-7	0,09862681	0,026315	0,170938625	0,0136554

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
CFU	7-6	-11083333	-17478760	-4687907	0,0006807
	8-6	-14316667	-20712093	-7921240	0,0000303
	8-7	-3233333	-9437809	2971142	0,4067304

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
OD	7-6	0,062011111	0,01645007	0,10757215	0,0064414
	8-6	0,071388889	0,02582785	0,11694993	0,0018316
	8-7	0,009377778	-0,03618326	0,05493882	0,8652784

Priloga Č: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis na točki 1

S testom normalne porazdelitve smo ugotovili, da podatki pri metodi štetja pod mikroskopom s pomočjo programa ImageJ [% živih] niso normalno porazdeljeni. Kljub temu, da so variance med skupinami homogene smo v naslednjem koraku izvedli Kruskal-Walis test in preverili, če sta vsaj dve skupini med seboj statistično značilni.

Metoda	DF	H (χ^2)	p-vrednost
ImageJ [% živih]	2	4,3556	0,1133

Hipotezo H_0 : skupine prihajajo iz iste populacije lahko potrdimo saj je dobljena vrednost H presegla kritično vrednost χ^2 pri 95 % stopnji zaupanja, pri tem je pripadajoča vrednost P večja od mejne vrednosti $\alpha = 0,05$.

Analiza je pokazala, da se skupine med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Priloga D: Analiza normalne porazdelitve s Shapiro-Wilk testom na točki 2

Za vsako skupino smo naredili test Shapiro-Wilk in preverili normalno porazdelitev vzorcev

Test	W	p - vrednost
ImageJ [% živih celic]	0,84332	0,06287
ImageJ [število živih celic]	0,91559	0,357
Live/Dead [% viabilnih]	0,93359	0,5163
Helm [% flokulacije]	0,72529	0,002799
OD [število delcev]	0,9687	0,5677
CFU [število kolonij]	0,95879	0,3468

Rezultati kažejo, da so podatki iz skupin metod: ImageJ [% živih celic], ImageJ [število živih celic], Live/Dead [% viabilnih], OD [število delcev], CFU [število kolonij] normalno razporejeni. Pri skupini Helm [% flokulacije], pa podatki niso normalno razporejeni.

Hipotezo H_0 : vzorci prihajajo iz populacije z normalno porazdelitvijo, lahko zavrnemo v primeru, da je pripadajoča vrednost P manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,05$.

Priloga E: Analiza homogenosti varianc z Levene testom na točki 2

Za vsako skupino smo naredili test Levene in preverili homogenost varianc vzorcev, ki je pomembna za primerjavo k-skupin med seboj s parametričnim testom ANOVA

Metoda	F-vrednost	p - vrednost
ImageJ [% živih celic]	0,77685	0,5012
ImageJ [število živih celic]	0,76433	0,5062
Live/Dead [% viabilnih]	0,81984	0,4844
Helm [% flokulacije]	0,3748	0,7025
OD [število delcev]	0,34599	0,711
CFU [število kolonij]	45,233	0,02153

Dobljene vrednosti F testa Levene presegajo kritično vrednost F-distribucije s k-1 in N-k prostorskih stopenj, pri izbrani stopnji zaupanja 95 %, pripadajoča vrednost P pa ni manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,005$. Zato lahko potrdimo hipotezo H_0 : variance skupin so homogene, pri vseh metodah razen pri metodi določanja kultivabilnosti CFU kjer je vrednost p manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,005$.

Priloga F: Analiza s parametričnim testom ANOVA s Tukey post-testom na točki 2

Za metode, ki imajo podatke normalno porazdeljene in so variance med skupinami homogene smo uporabili parametrični test ANOVA s Tukey post-testom. Rezultati analize s parametričnim testom ANOVA. Pri čemer je SS vsota kvadratov odklonov in DF diskriminantna funkcija.

Metoda		DF	SS	Kvadratna vrednost	F-vrednost	Prob>F
ImageJ [% živih]	model	2	0,0001464	0,0000732	0,63	0,565
	napaka	6	0,0006974	0,0001162		
ImageJ [število celic]	model	2	8,61E+13	4.31E+13	0,515	0,622
	napaka	6	5,01E+14	8.36E+13		
Live/Dead	model	2	0,20054	0,10027	26,25	0,00108
	napaka	6	0,02292	0,00382		
OD	model	2	0,0788	0,0394	36,05	5,89 E-8
	napaka	24	0,02623	0,00109		

Rezultati analize s Tukey post-testom.

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
ImageJ [% živih]	19-18	0,005492015	-0,02151751	0,03250154	0,8129644
	20-18	0,009857855	-0,01715167	0,03686738	0,5376216
	20-19	0,004365684	-0,02264369	0,03137537	0,8758579

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
ImageJ [število celic]	19-18	5270092	-17630121	28170306	0,7689776
	20-18	-2079216	-24979430	20820997	0,9584131
	20-19	-7349308	-30249522	15550905	0,9584131

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
Live/Dead	19-18	-0,3616902	-0,51652477	-0,20685563	0,0009093
	20-18	-0,1343978	-0,28923241	0,02043673	0,082955
	20-19	0,2272924	0,07245779	0,38212693	0,0097131

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
OD	19-18	0,04761111	0,008692329	0,08652989	0,0145065
	20-18	0,13073333	0,091814551	0,16965212	0
	20-19	0,08312222	0,04420344	0,122041	0,0000516

Priloga G: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis na točki 2

S testom normalne porazdelitve smo ugotovili, da podatki pri določanja flokulacije z metodo Helm niso normalno porazdeljeni, pri ostalih metodah so podatki normalno porazdeljeni. Variance med skupinami so homogene pri vseh metodah z izjemo določanja kultivabilnosti z metodo CFU. Nadalje smo pri določanju flokulacije z metodo Helm in določanju kultivabilnosti metodo CFU v naslednjem koraku izvedli Kruskal-Walis test in preverili, če sta vsaj dve skupini med seboj statistično značili.

Metoda	DF	H (χ^2)	p-vrednost
Helm [% flokulacije]	2	7,2	0,02732
CFU	2	15,442	0,0004435

Hipotezo H_0 : skupine prihajajo iz iste populacije lahko zavrnemo za obe metodi, saj je dobljena vrednost H presegla kritično vrednost χ^2 pri 95 % stopnji zaupanja, pri tem je pripadajoča vrednost P manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,05$.

Analiza je pokazala, da sta vsaj dve skupini med seboj statistično značilno različni. Pri tem nismo izvedeli, kateri dve skupini sta to, da bi to izvedeli, smo uporabili še neparametrični post-test Mann-Whitney z Bonferronijevo korelacijo ravni zavrnitve.

Priloga H: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami s post-testom MannWhitney in Bonferronijevo korelacijo

Mann-Whitney test smo izvedeli, da bi ugotovili, katere skupine so si med seboj statistično značilno različne. Izvedli smo ga tako, da smo primerjali vsak par primerjanih skupin. Z uporabo Bonferronijeve korelacije ravni zavrnitve glede na število vseh primerjav, smo ob 95 % stopnji zaupanja določili kritično vrednost zavrnitve $\alpha = 0,0125$. Ker smo imeli pri metodi določanja flokulacije (Helm) premalo podatkov, smo ga izvedli samo za metodo določanja kultivabilnosti CFU.

Metoda	Primerjava skupin	p-vrednost
Določanje kultivabilnosti CFU	19-18	0,0032
	20-18	0,8664
	20-19	0,0032

Rezultati so pokazali, da se skupine med seboj statistično razlikujejo, razen skupini 20-18, ki se med seboj statistično ne razlikujeta.

Priloga I: Analiza normalne porazdelitve s Shapiro-Wilk testom na točki 3

Za vsako skupino smo naredili test Shapiro-Wilk in preverili normalno porazdelitev vzorcev.

Test	W	p - vrednost
ImageJ [% živih celic]	0,90529	0,1856
ImageJ [število živih celic]	0,90853	0,2043
Live/Dead [% viabilnih]	0,89273	0,1278
Helm [% flokulacije]	0,92497	0,3299
OD [število delcev]	0,89684	0,0028
CFU [število kolonij]	0,93853	0,04574

Rezultati kažejo, da so podatki iz skupin metod: ImageJ [% živih celic], ImageJ [število živih celic], Live/Dead [% viabilnih], Helm [% flokulacije] normalno razporejeni. Pri skupinah metode OD [število delcev] in CFU [število kolonij] pa podatki niso normalno razporejeni.

Hipotezo H_0 : vzorci prihajajo iz populacije z normalno porazdelitvijo, lahko zavrnemo v primeru, da je pripadajoča vrednost P manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,05$.

Priloga J: Analiza homogenosti varianc z Levene testom točki 3

Za vsako skupino smo naredili test Levene in preverili homogenost varianc vzorcev, ki je pomembna za primerjavo k-skupin med seboj s parametričnim testom ANOVA.

Metoda	F-vrednost	p - vrednost
ImageJ [% živih celic]	0,21171	0,8855
ImageJ [število živih celic]	0,26363	0,8498
Live/Dead [% viabilnih]	0,58545	0,6413
Helm [% flokulacije]	1,226	0,3618
OD [število delcev]	16,135	0,2056
CFU [število kolonij]	0,96817	0,4198

Dobljene vrednosti F testa Levene presegajo kritično vrednost F-distribucije s k-1 in N-k prostorskih stopenj, pri izbrani stopnji zaupanja 95 %, pripadajoča vrednost P ni manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,005$. Zato lahko potrdimo hipotezo H_0 : variance skupin so homogene.

Priloga K: Analiza s parametričnim testom ANOVA s Tukey post-testom na točki 3

Za metode, ki imajo podatke normalno porazdeljene in so variance med skupinami homogene smo uporabili parametrični test ANOVA s Tukey post-testom.

Rezultati analize s parametričnim testom ANOVA. Pri čemer je SS vsota kvadratov odklonov in DF diskriminantna funkcija.

Metoda		DF	SS	Kvadratna vrednost	F-vrednost	Prob>F
ImageJ [% živih]	model	3	0,0001464	0,0000338	1,4	0,312
	napaka	8	0,0001931	0,00002414		
ImageJ [število živih celic]	model	3	4.66E+15	1.55E+15	29,48	0,000113
	napaka	8	4.22E+14	5.27E+13		
Live/Dead	model	3	0,004496	0,0014987	2,409	0,142
	napaka	8	0,004978	0,0006222		
Helm	model	3	0,17273	0,05758	26,6	0,000163
	napaka	8	0,01732	0,00216		

Rezultati analize s Tukey post-testom.

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
ImageJ [število živih celic]	26-27	19412879	427861,1	38397896	0,0451776
	28-26	-27091568	-46076585,5	-8106550	0,0079054
	29-26	22294960	3309942,8	41279978	0,0230251
	28-27	-46504447	-65489464,3	-27519429	0,0002314
	29-27	2882082	-16102936	21867099	0,9600375
	29-28	49386528	30401510,6	68371546	0,0001506

Metoda	Primerjava skupin	razlika	spodnja vrednost	zgornja vrednost	prilagojena p-vrednost
Helm	26-27	-0,05935759	-0,18100676	0,06229159	0,4483435
	28-26	0,1828541	0,06120492	0,30450328	0,0058175
	29-26	-0,14395725	-0,26560642	-0,02230807	0,0221338
	28-27	0,24221169	0,12056251	0,36386086	0,0009708
	29-27	-0,08459966	-0,20624883	0,03704952	0,1955265
	29-28	-0,32681135	-0,44846052	-0,20516217	0,0001193

Priloga L: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami z neparametričnim testom Kruskal-Walis na točki 3

S testom normalne porazdelitve smo ugotovili, da podatki pri metodah določanja števila delcev OD in določanja kultivabilnosti s CFU niso normalno porazdeljeni, pri ostalih metodah so podatki normalno porazdeljeni. Variance med skupinami so homogene pri vseh metodah. Nadalje smo pri določanju števila delcev OD in določanju kultivabilnosti z metodo CFU v naslednjem koraku izvedli Kruskal-Walis test in preverili, če sta vsaj dve skupini med seboj statistično različni.

Metoda	DF	H (χ^2)	p-vrednost
OD	3	32,077	5,041e-07
Določanje kultivabilnosti CFU	3	18,848	0,000294

Hipotezo H_0 : skupine prihajajo iz iste populacije lahko zavrnemo za obe metodi, saj je dobljena vrednost H presegla kritično vrednost χ^2 pri 95 % stopnji zaupanja, pri tem je pripadajoča vrednost P manjša od mejne vrednosti $\alpha = 0,05$.

Analiza je pokazala, da sta vsaj dve skupini med seboj statistično značilno različni, pri tem nismo izvedeli, kateri dve skupini sta to, da bi to izvedeli, smo uporabili še neparametrični post-test Mann-Whitney z Bonferronijevo korelacijo ravni zavrnitve.

Priloga M: Analiza statistično značilnih razlik med skupinami s post-testom MannWhitney in Bonferronijevo korelacijo

Mann-Whitney test smo izvedeli, da bi ugotovili, katere skupine so si med seboj statistično značilno različne. Izvedli smo ga tako, da smo primerjali skupine med seboj. Z uporabo Bonferronijeve korelacije ravni zavrnitve glede na število vseh primerjav, smo ob 95 % stopnji zaupanja določili kritično vrednost zavrnitve $\alpha = 0,0125$. Ker smo imeli pri metodi določanja flokulacije (Helm) premalo podatkov, smo ga izvedli samo za metodo določanja kultivabilnosti CFU.

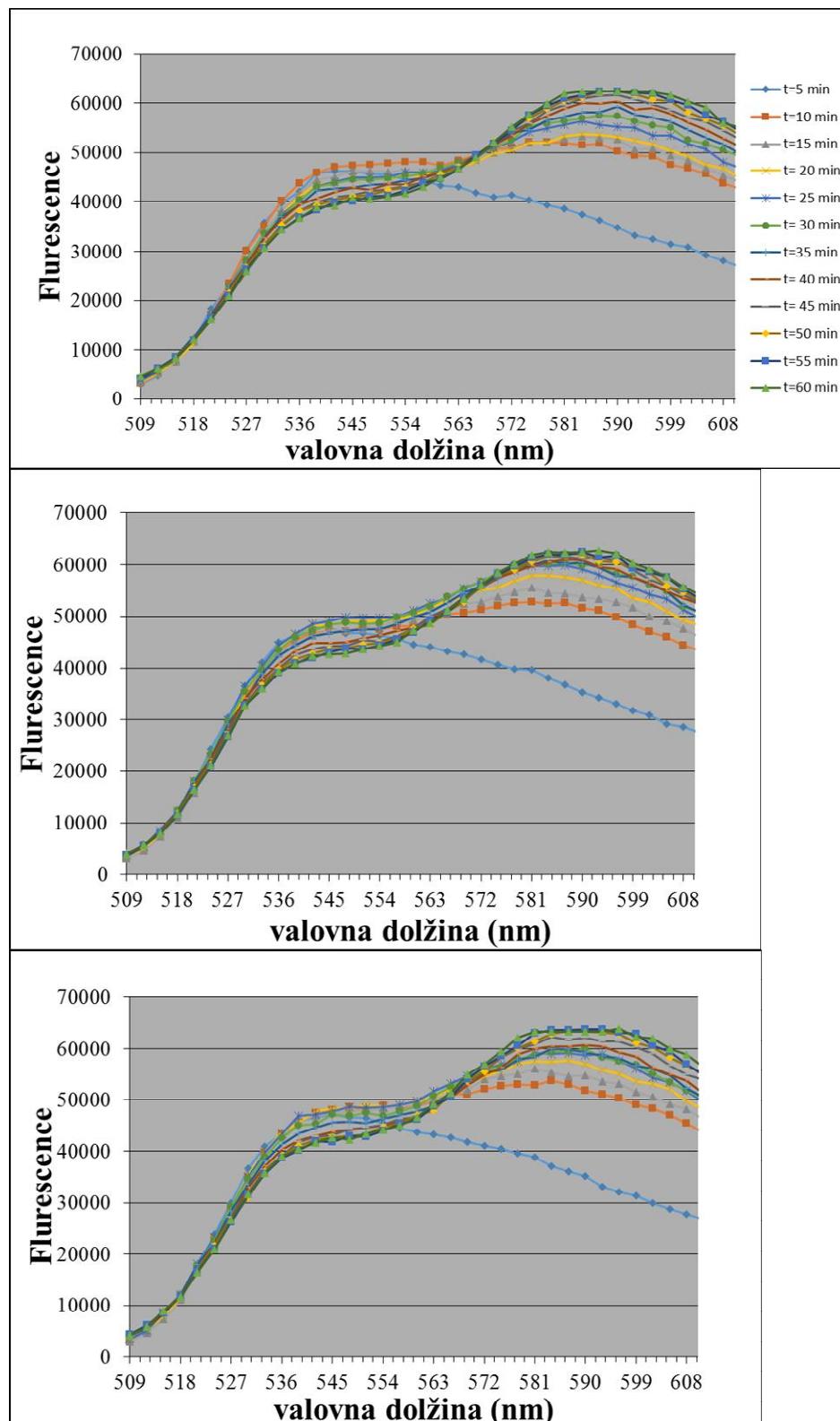
Metoda	Primerjava skupin	p-vrednost
Določanje kultivabilnosti CFU	26-27	0,0025
	28-26	0,0025
	29-26	0,012
	28-27	0,0025
	29-27	0,0025
	29-28	0,0025

Rezultati so pokazali, da se skupine pri metodi določanja kultivabilnosti CFU med seboj statistično značilno razlikuje vseh šest parov skupin.

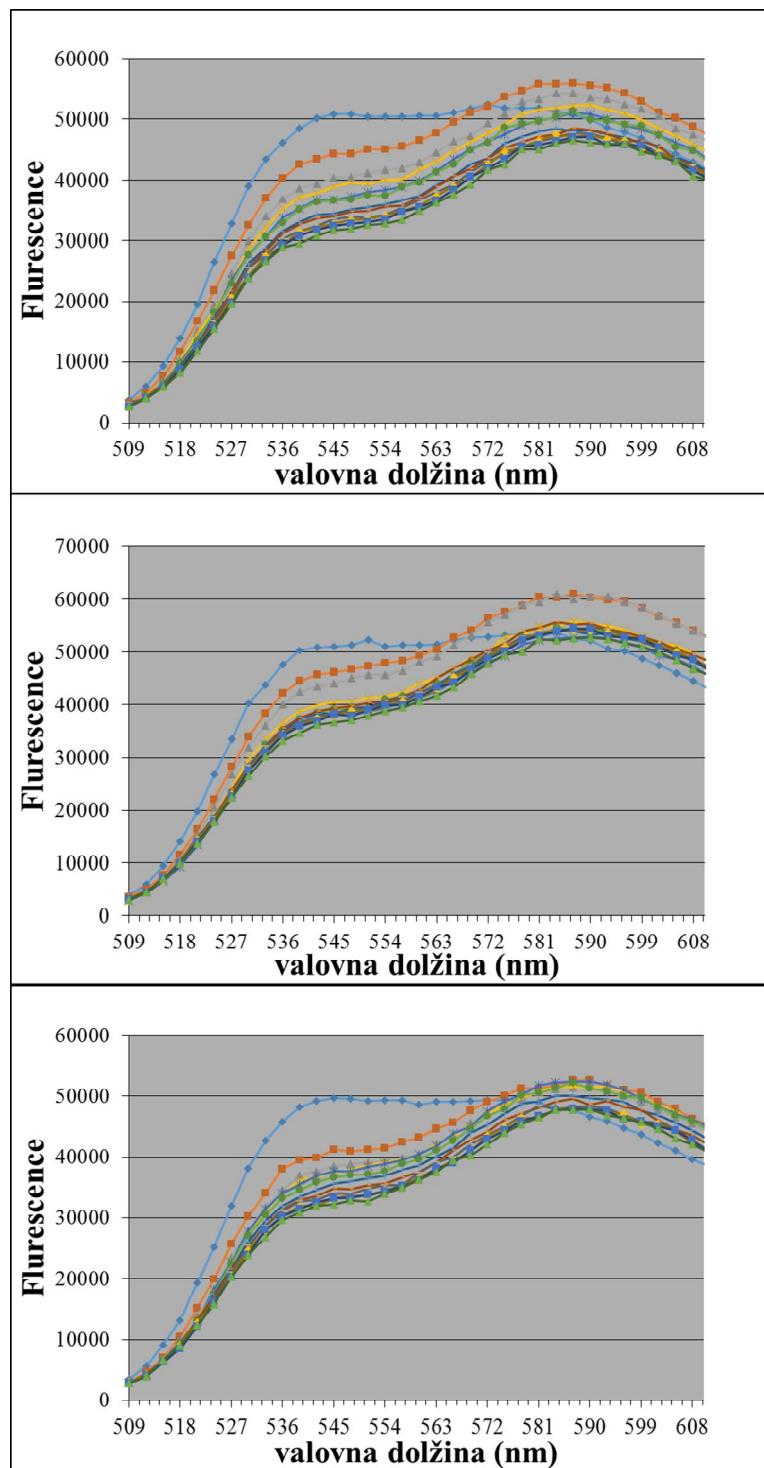
Metoda	Primerjava skupin	p-vrednost
Določanje števila delcev OD	26-27	1,0000
	28-26	0,0065
	29-26	1,0000
	28-27	0,0025
	29-27	1,0000
	29-28	0,0025

Rezultati so pokazali, da se pri metodi določanja števila delcev OD statistično značilno razlikujejo naslednje skupine: 28-26; 28-27 in 29-28 ostale skupine se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

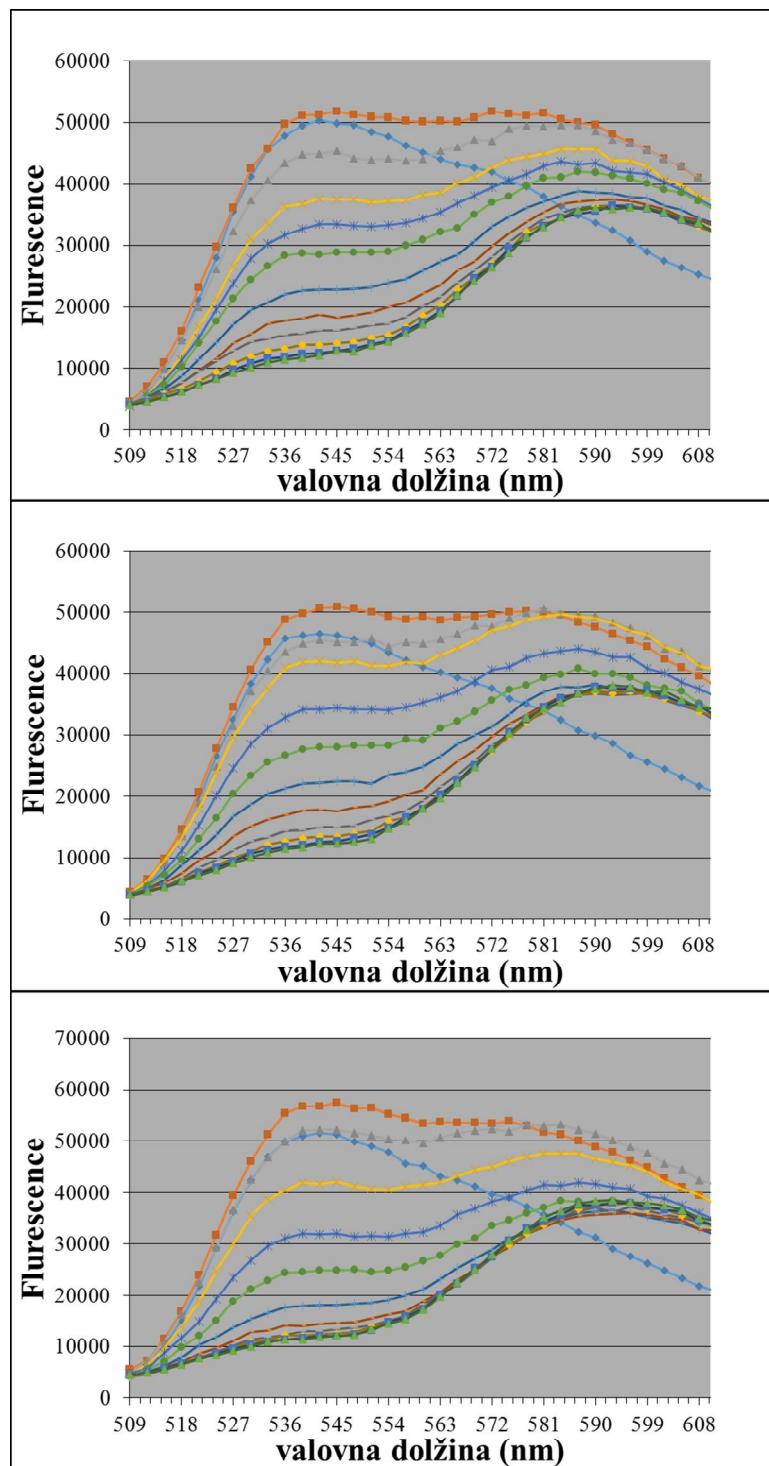
Priloga N: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 6F



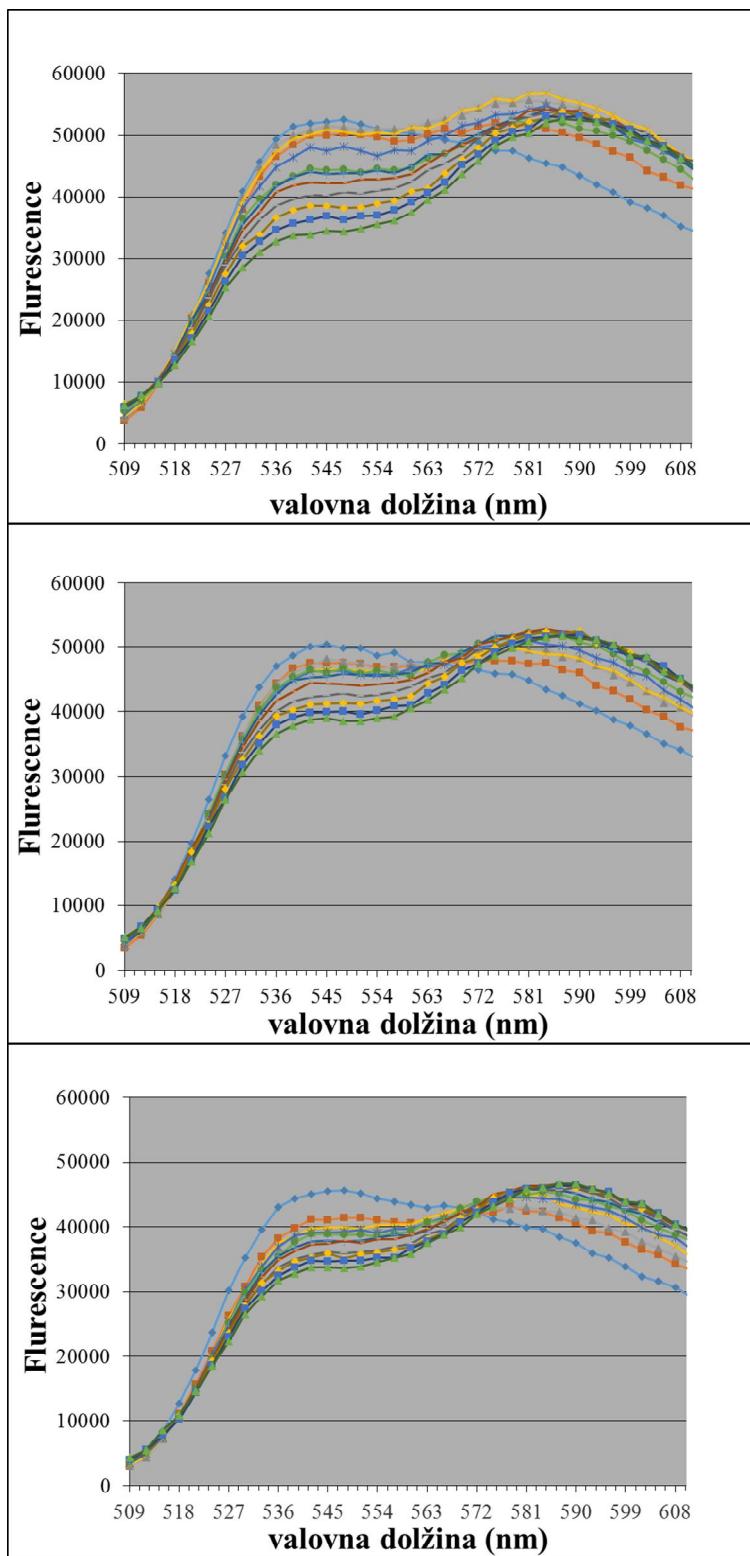
Priloga O: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 7G



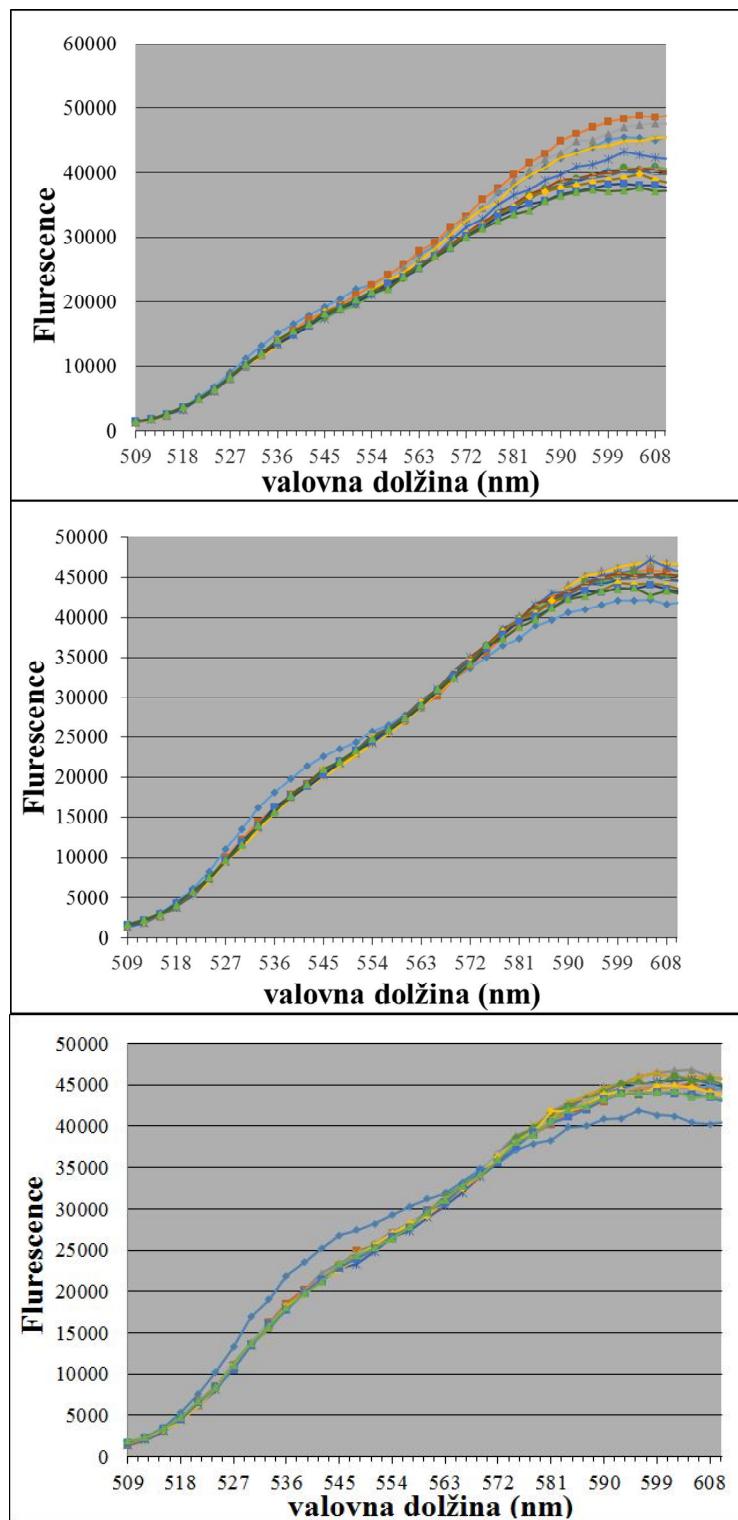
Priloga P: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 8H



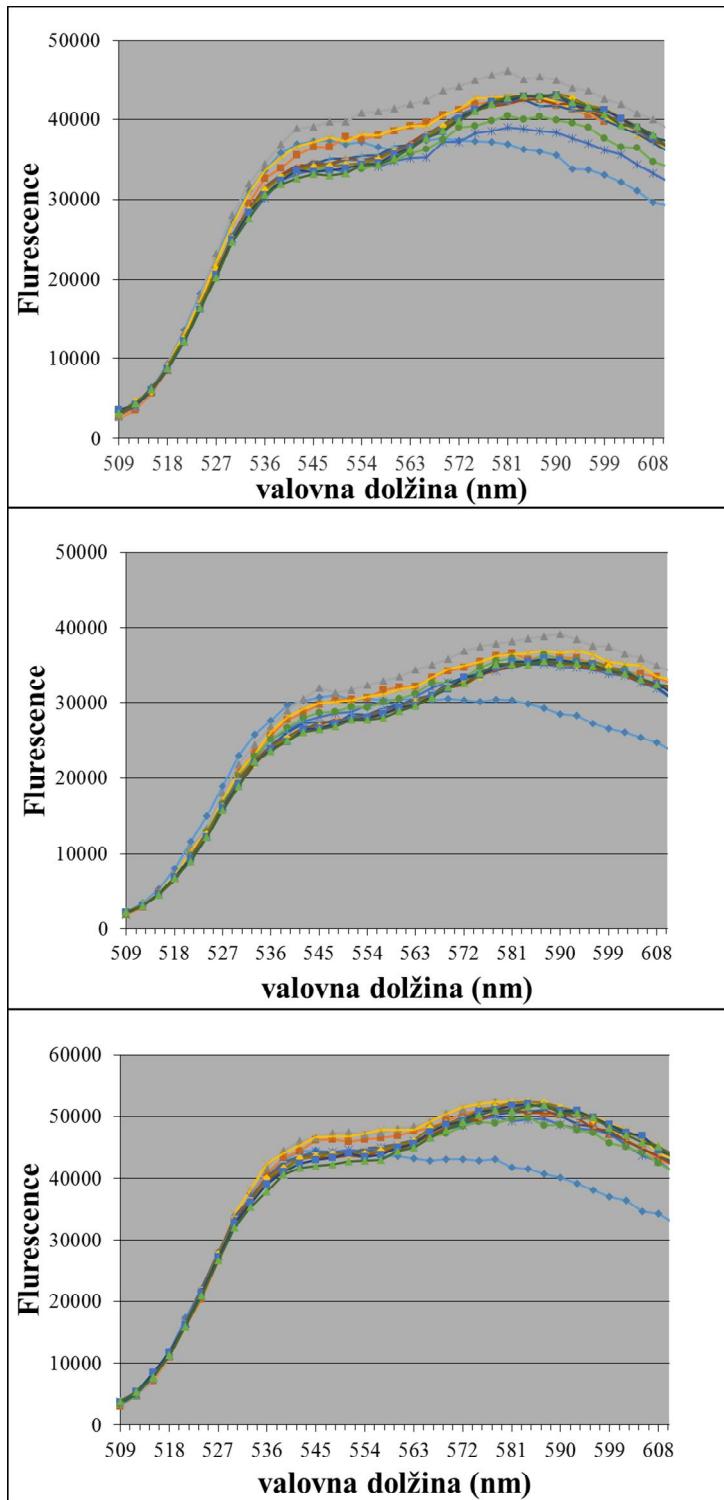
Priloga D: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 18S



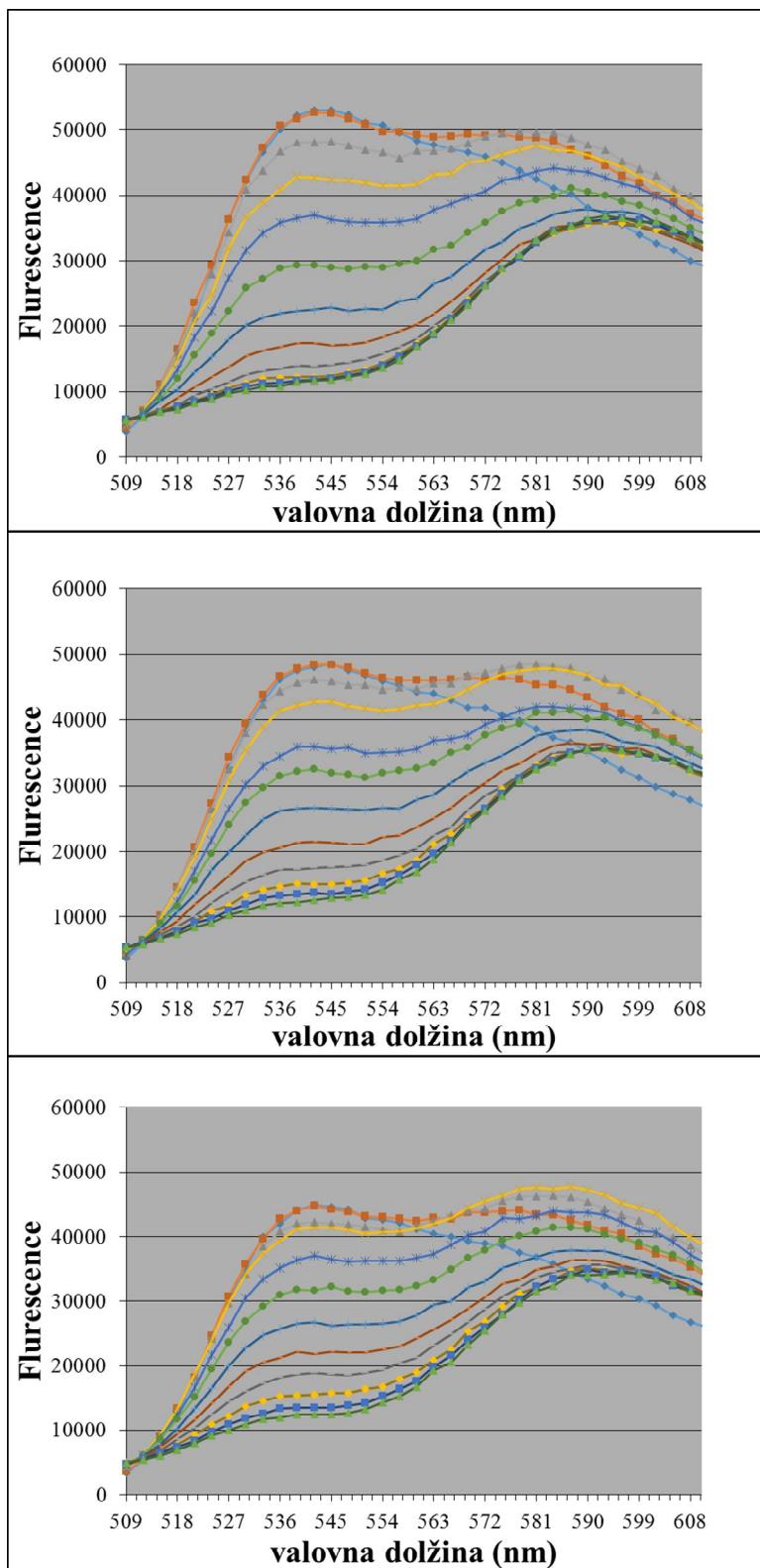
Priloga E: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh lpri ponovni inokulaciji 19T



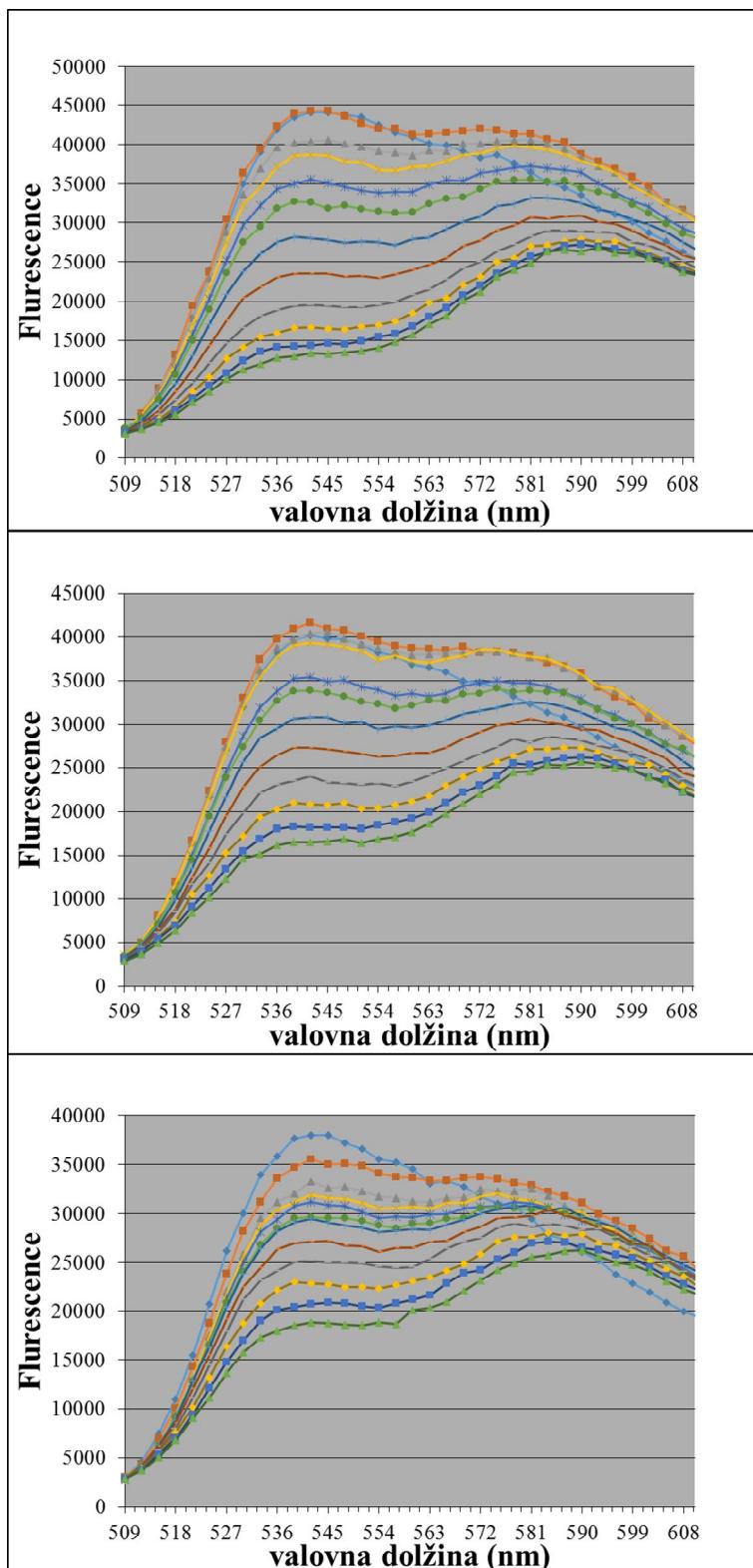
Priloga Š: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelki pri ponovni inokulaciji 20U



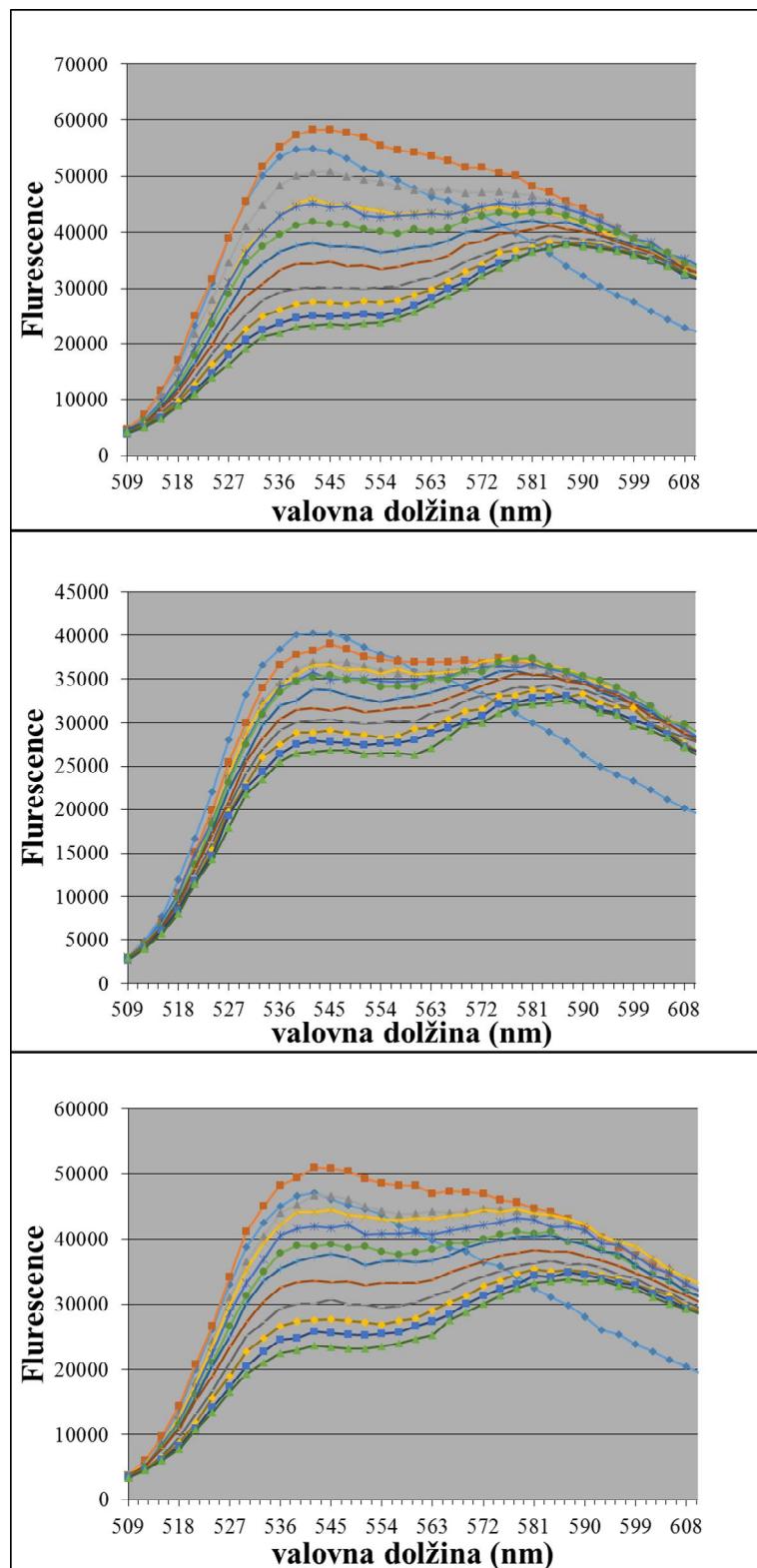
Priloga T: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 26AA



Priloga U: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 27AB



Priloga V: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 28AC



Priloga Z: Grafi meritev kinetike z uporabo spektrofotometra in Live/Dead kita za določanje vitalnosti kvasovk treh paralelk pri ponovni inokulaciji 29AD

