

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara KUREŽ

**VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA
ALKOHOLNO FERMENTACIJO PRI KVASOVKI**
Candida stellata

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara KUREŽ

**VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA ALKOHOLNO
FERMENTACIJO PRI KVASOVKI *Candida stellata***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF GLUCOSE/FRUCTOSE RATIO ON ALCOHOLIC
FERMENTATION WITH *Candida stellata***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja in za recenzentko prof. dr. Nino Gunde Cimerman.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Recenzentka: prof. dr. Nina Gunde Cimerman

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter Raspor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara Kurež

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 663.252.41:547.455.623:547.455.633(043)=863
KG kvasovke/vinske kvasovke /*Candida stellata*/kemijsko definiran mošt/alkoholna fermentacija/glukoza/fruktoza/etanol/glikolitični encimi/heksokinaza/fosfofruktokinaza/piruvat kinaza
AV KUREŽ, Barbara
SA RASPOR, Peter (mentor)/GUNDE CIMERMAN, Nina (recenzentka)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2007
IN VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA ALKOHOLNO FERMENTACIJO PRI KVASOVKI *Candida stellata*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XV, 75 str., 16 pregl., 24 sl., 22 pril., 108 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Na podlagi podatkov, da kvasovka *Candida stellata* prednostno porablja fruktozo, smo preverjali vpliv začetnega razmerja glukoza/fruktoza na potek alkoholne fermentacije pri tej vrsti kvasovke. Za gojišče smo uporabili kemijsko definiran mošt z različnim začetnim razmerjem glukoze in fruktoze. Skupna začetna koncentracija sladkorjev je bila 400 g/l. Med potekom alkoholne fermentacije smo spremljali sproščanje CO₂, spreminjanje vrednosti pH bioprocesne brozge, spreminjanje vrednosti OD₆₅₀ in z analizami HPLC porabo glukoze in fruktoze ter sintezo nekaterih ključnih metabolnih produktov alkoholne fermentacije – etanola, glicerola in očetne kisline. Preverili smo tudi specifične aktivnosti ključnih glikolitičnih encimov: heksokinaze, fosfofruktokinaze in piruvat kinaze. Preverili smo še fermentacijsko učinkovitost dveh mutant kvasovke *C. stellata*. V ta namen smo uporabili kemijsko definiran mošt z enakima začetnima količinama glukoze in fruktoze. Ugotovili smo, da kvasovka *C. stellata* prednostno porablja fruktozo. Manjše kot je bilo razmerje glukoza/fruktoza, več etanola se je sintetiziralo in bolj metabolno aktivne so bile kvasovke. Mutanti *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 sta učinkoviteje pretvarjali glukozo in fruktozo v etanol in CO₂ kot starševski sev *C. stellata* ZIM 1842. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave, da bi na molekularnem nivoju bolje opredelili kinetiko in mehanizem porabe fruktoze med enološko fermentacijo s kvasovko *C. stellata*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 663.252.41:547.455.623:547.455.633(043)=863
CX yeasts/wine yeasts /*Candida stellata*/chemically defined must/alcoholic fermentation/
glucose/fructose/ethanol/glycolytic enzymes/hexokinase/ phosphofructokinase/
pyruvate kinase
AU KUREŽ, Barbara
AA RASPOR, Peter (supervisor)/GUNDE CIMERMAN, Nina (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2007
TI THE INFLUENCE OF GLUCOSE/FRUCTOSE RATIO ON ALCOHOLIC
FERMENTATION WITH *Candida stellata*
DT Graduation thesis (University studies)
NO XV, 75 p., 16 tab., 24 fig., 22 ann., 108 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The object of ours studies has been fructophily of yeast *Candida stellata*. We examined the influence of glucose to fructose ratios on alcoholic fermentation with the same yeast species. As a growth medium chemically defined must containing different ratios of glucose and fructose was used. Total concentration of sugars was 400 g/l. During alcoholic fermentation pH, OD₆₅₀, the release of CO₂ and the consumption of sugars and productions of ethanol, glycerol and acetic acid were determined by HPLC. We also determined specific activities of key glycolytic enzymes: hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. We also tested two mutants of yeast *C. stellata* for their fermentation effectiveness. As a growth medium chemically defined must containing equal ratios of glucose and fructose was used. We have shown that yeast *C. stellata* rather utilizes fructose than glucose. Lower that had been glucose to fructose ratios, more ethanol has been produced and more metabolically active yeasts have been. Mutants *C. stellata* ZIM 2287 and *C. stellata* ZIM 2290 have converted glucose and fructose to ethanol and CO₂ with better effect than the original strain *C. stellata* ZIM 1842. Further investigation is needed to characterize the kinetics and mechanisms of fructose utilisation during enological fermentation with yeast *C. stellata*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
SLOVARČEK	XV
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 UPOČASNJENA (ang. »SLUGGISH«) IN ZAUSTAVLJENA (ang. »STUCK«) ENOLOŠKA FERMENTACIJA.....	3
2.1.1. Vpliv razmerja glukoza/fruktoza (GF) na upočasnitev in prezgodnjo zaustavitev enološke fermentacije	4
2.1.1.1 Možni vzroki za počasnejšo porabo fruktoze med fermentacijo mošta	5
2.2 ENOLOŠKA FERMENTACIJA.....	6
2.2.1 Tradicionalna in sodobna proizvodnja vina	6
2.2.1.1 Kvasovke pri tradicionalni in sodobni proizvodnji vina	7
2.2.1.2 Uporaba čistih in združenih kvasnih kultur kot vcepek pri proizvodnji vina.....	7
2.2.1.2.1. Uporaba kvasovke <i>Candida stellata</i> v združenih kulturah s kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
2.2.2 Kinetika rasti kvasovk med alkoholno fermentacijo	9
2.3 GROZDNI SOK	10
2.3.1 Sestava grozdnega soka	10
2.3.1.1 Sladkorji	10
2.3.1.2 Dušik.....	11
2.3.1.3 Ostale komponente	11
2.4 ALKOHOLNA FERMENTACIJA	12
2.4.1 Glikoliza in metabolizem piruvata v etanol	12
2.4.2 Uravnavanje glikolize	14
2.4.2.1 Transport in fosforilacija sladkorjev (heksokinaza (HXK)).....	14
2.4.2.2 Fosfofruktokinaza (PFK).....	15
2.4.2.3 Piruvat kinaza (PYK)	15
2.4.3 Stresni dejavniki med alkoholno fermentacijo	15
2.4.3.1 Osmotski stres in sinteza glicerola	16
2.4.3.2 Etanol.....	17
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 POTEK DELA.....	18

3.2	MATERIAL	19
3.2.1	Mikroorganizem	19
3.2.2	Mikrobiološka gojišča	19
3.2.2.1	Kemijsko definiran mošt (CDM).....	19
3.2.2.2	Trdno gojišče YM.....	19
3.2.3	Raztopine	20
3.2.3.1	Fiziološka raztopina.....	20
3.2.4	Reagenti	20
3.2.5	Oprema in aparature	21
3.3	METODE	22
3.3.1	Gojitvene metode	22
3.3.1.1	Metoda namnožitve biomase za vcepki	22
3.3.1.2	Anaerobni šaržni bioproces (alkoholna fermentacija).....	22
3.3.2	Analitične metode	23
3.3.2.1	Merjenje prirasta biomase z merjenjem optične gostote brozge	23
3.3.2.2	Merjenje vrednosti pH	23
3.3.2.3	Spremljanje tvorbe ogljikovega dioksida (CO ₂).....	23
3.3.2.4	Določanje koncentracije glukoze, fruktoze in zunajceličnih metabolitov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) v bioprocesni brozgi.....	23
3.3.2.5	Določanje skupnega števila kvasovk in njihove živosti	24
3.3.2.6	Določanje koncentracije suhe biomase.....	24
3.3.2.7	Priprava celičnega ekstrakta	24
3.3.2.8	Določanje količine topnih proteinov v celičnem ekstraktu	25
3.3.2.9	Določanje aktivnosti glikolitičnih encimov v celičnem ekstraktu	26
3.3.3	Metode za obdelavo podatkov	29
3.3.3.1	Statistična obdelava podatkov	29
3.3.3.2	Določitev ravnih parametrov	30
4	REZULTATI.....	32
4.1	VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA ALKOHOLNO FERMENTACIJO PRI KVASOVKI <i>Candida stellata</i> ZIM 1842	33
4.1.1	Gojenje kvasovke in namnoževanje vcepka.....	33
4.1.2	Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo	34
4.1.3	Sproščanje ogljikovega dioksida (CO₂)	35
4.1.4	Fermentacijski profili.....	36
4.1.5	Dinamika porabe sladkorjev v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza	38
4.1.6	Dinamika tvorbe metabolnih produktov v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza	40
4.1.7	Hitrosti porabe sladkorjev in nastajanja metabolnih produktov ter izkoristki po 43. dneh fermentacije.....	43
4.1.8	Sprememba vrednosti pH gojišča med fermentacijo	44
4.1.9	Specifična aktivnost glikolitičnih encimov	45
4.1.9.1	Po 14. dneh fermentacije	45
4.1.9.2	Po 43. dneh fermentacije	45

4.2	ALKOHOLNA FERMENTACIJA GOJIŠČA CDM Z MUTANTAMA <i>Candida stellata</i> ZIM 2287 IN <i>Candida stellata</i> ZIM 2290	46
4.2.1	Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo	46
4.2.2	Sproščanje ogljikovega dioksida (CO ₂)	47
4.2.3	Fermentacijski profili.....	48
4.2.4	Dinamika porabe sladkorjev ob fermentaciji gojišča CDM z mutantama <i>Candida stellata</i> ZIM 2287 in <i>Candida stellata</i> ZIM 2290	50
4.2.5	Dinamika tvorbe metabolnih produktov ob fermentaciji gojišča CDM z mutantama <i>Candida stellata</i> ZIM 2287 in <i>Candida stellata</i> ZIM 2290	52
4.2.6	Hitrosti porabe sladkorjev in nastajanja metabolnih produktov ter izkoristki po 43. dneh fermentacije.....	55
4.2.7	Sprememba vrednosti pH gojišča med alkoholno fermentacijo	56
4.2.8	Specifična aktivnost glikolitičnih encimov	56
4.2.8.1	Po 14. dneh fermentacije	57
4.2.8.2	Po 43. dneh fermentacije	57
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	58
5.1	FERMENTACIJA KEMIJSKO DEFINIRANEGA MOŠTA (CDM) S ČISTO KULTURO KVASOVKE <i>Candida stellata</i> ZIM 1842	58
5.1.1	Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo in sproščanje CO ₂	58
5.1.2.	Dinamika porabe sladkorjev in tvorbe metabolnih produktov v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem sladkorjev glukoze in fruktoze.....	59
5.1.3	Hitrosti porabe sladkorjev in izkoristki	62
5.2	PRIMERJAVA FERMENTACIJSKE UČINKOVITOSTI MUTIRANIH SEVOV <i>Candida stellata</i> ZIM 2287 IN <i>Candida stellata</i> ZIM 2290 S FERMENTACIJSKO UČINKOVITOSTJO STARŠEVSKEGA SEVA <i>Candida stellata</i> ZIM 1842	62
5.2.1	Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo in sproščanje CO ₂	62
5.2.2.	Dinamika porabe sladkorjev in tvorbe metabolnih produktov v gojišču CDM med fermentacijo z različnimi sevi kvasovke <i>Candida stellata</i>	63
5.2.3	Hitrosti porabe sladkorjev in izkoristki	63
5.3	SPECIFIČNA AKTIVNOST GLIKOLITIČNIH ENCIMOV	64
5.5	SKLEPI.....	65
6	POVZETEK.....	66
7	VIRI	67

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

- Preglednica 1: Število kolonijskih enot v 1 ml gojišča (CFU/ml) in ocena živosti kvasovk *C. stellata* ZIM 1842 po končani 43-dnevni fermentaciji gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 35
- Preglednica 2: Poraba in relativna poraba sladkorjev v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza po 43-dnevni fermentaciji s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Rezultati so izračunani glede na začetne in končne koncentracije sladkorjev v gojiščih in so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 40
- Preglednica 3: Masa glicerola (g), ki se je sintetizirala na 1 g porabljenih sladkorjev med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev in standardni odkloni (SD). _____ 42
- Preglednica 4: Koncentracija oetne kisline po 43 dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 43
- Preglednica 5: Specifične hitrosti porabe sladkorjev (q_s) in sinteze etanola (q_{EtOH}), glicerola ($q_{glic.}$), oetne kisline ($q_{ocet.k.}$), CO₂ (q_{CO_2}) ter maksimalna specifična hitrost rasti (μ_{max}) po 43 dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Podane so povprečne vrednosti in standardni odkloni (SD). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 43
- Preglednica 6: Izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase ($Y_{X/S}$) in sintezo etanola ($Y_{E/S}$) po 43 dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Podane so povprečne vrednosti in standardni odkloni (SD). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 44
- Preglednica 7: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) (U/mg) po 14 dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 45
- Preglednica 8: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) (U/mg) po 43 dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 46
- Preglednica 9: Število kolonijskih enot v 1 ml gojišča (CFU/ml) in ocena živosti kvasovk po končani 43-dnevni fermentaciji gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 47
- Preglednica 10: Poraba in relativna poraba sladkorjev v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l po 43-dnevni fermentaciji s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so izračunani glede na začetne in končne koncentracije sladkorjev v gojiščih in so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 51

- Preglednica 11: Masa glicerola (g), ki se je sintetizirala na 1 g porabljenih sladkorjev med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l z različnimi sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev in standardni odklon (SD). _____ 54
- Preglednica 12: Koncentracija oetne kisline po 43 dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 54
- Preglednica 13: Specifične hitrosti porabe sladkorjev (q_s) in sinteze etanola ($q_{E_{10H}}$), glicerola ($q_{glic.}$), oetne kisline ($q_{ocet.k.}$), CO₂ (q_{CO_2}) ter maksimalna specifična hitrost rasti (μ_{max}) po 43 dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Podane so povprečne vrednosti in standardni odklon (SD). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 55
- Preglednica 14: Izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase ($Y_{X/S}$) in sintezo etanola ($Y_{E/S}$) po 43 dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Podane so povprečne vrednosti in standardni odkloni (SD). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 55
- Preglednica 15: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) (U/mg) po 14 dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 57
- Preglednica 16: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) (U/mg) po 43 dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 57

KAZALO SLIK

- Slika 1: Potek glikolize po EMP poti (Gancedo in Serrano, 1989; Walker, 1998; Ratledge, 2006). _____ 13
- Slika 2: Hodogram alkoholne fermentacije CDM z različnimi začetnimi razmerji glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata*. _____ 18
- Slika 3: Rastna krivulja kvasovke *C. stellata* ZIM 1842 pri 28 °C med 25-urnim aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku (200 vtr./min) v kemijsko definiranem moštu (CDM) z različnimi koncentracijami sladkorjev: 10 g/l glukoze in 10 g/l fruktoze (-▲-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-■-). _____ 33
- Slika 4: Spreminjanje vrednosti OD₆₅₀ med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza zaradi rasti kvasovke *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (◆; —); 400 g/l fruktoze (■; —); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (▲; —). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 34
- Slika 5: dCO₂/dt med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-◆-); 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 35
- Slika 6: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 1842 v gojišču CDM z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l. Prikazana je poraba glukoze (-◆-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) med 43-dnevno fermentacijo. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 36
- Slika 7: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 1842 v gojišču CDM z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l. Prikazana je poraba fruktoze (-■-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) med 43-dnevno fermentacijo. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 37
- Slika 8: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 1842 v gojišču CDM z začetnimi koncentracijami glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Prikazana je poraba glukoze (-◆-) in fruktoze (-■-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) med 43-dnevno fermentacijo. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 37
- Slika 9: Poraba glukoze med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-◆-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 38
- Slika 10: Poraba fruktoze med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 39
- Slika 11: Relativna poraba sladkorjev v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza med fermentacijo s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-◆-); 400 g/l fruktoze (-◇-); 200 g/l glukoze (-▲-); 200 g/l fruktoze (-Δ-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 40
- Slika 12: Sinteza etanola med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-◆-); 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 41

- Slika 13: Sinteza glicerola med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-◆-); 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 42
- Slika 14: Spreminjanje vrednosti pH v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza med fermentacijo s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-◆-); 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 44
- Slika 15: Spreminjanje vrednosti OD₆₅₀ med fermentacijo zaradi rasti sevov kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (▲; —), ZIM 2287 (×; —) in ZIM 2290 (○; —) v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 47
- Slika 16: dCO₂/dt med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-×-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 48
- Slika 17: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 2287 v gojišču CDM z začetnimi koncentracijami glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Prikazana je poraba glukoze (-◆-) in fruktoze (-■-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) v 43-dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. ___ 49
- Slika 18: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 2290 v gojišču CDM z začetnimi koncentracijami glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Prikazana je poraba glukoze (-◆-) in fruktoze (-■-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) v 43-dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. ___ 49
- Slika 19: Poraba glukoze med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-×-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 50
- Slika 20: Poraba fruktoze med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-×-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 51
- Slika 21: Relativna poraba sladkorjev v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l med fermentacijo s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev), ZIM 2287 in ZIM 2290: *C. stellata* ZIM 1842 in glukoza (-▲-); *C. stellata* ZIM 1842 in fruktoza (-Δ-); *C. stellata* ZIM 2287 in glukoza (-■-); *C. stellata* ZIM 2287 in fruktoza (-□-); *C. stellata* ZIM 2290 in glukoza (-●-); *C. stellata* ZIM 2290 in fruktoza (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 52
- Slika 22: Sinteza etanola med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-×-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 53
- Slika 23: Sinteza glicerola med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-×-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 53
- Slika 24: Spreminjanje vrednosti pH v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l med fermentacijo s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-×-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev. _____ 56

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Sestava kemijsko definirane mošta (CDM) (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992).
- PRILOGA A1: Protokol za pripravo založnih raztopin mineralov.
- PRILOGA A2: Protokol za pripravo založne raztopine vitaminov.
- PRILOGA A3: Protokol za pripravo založne raztopine aminokislin.
- PRILOGA B: Razmerja glukoze in fruktoze ter sevi kvasovke *Candida stellata* v posameznem CDM (osenčeno).
- PRILOGA C1: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradfordu v vzorcih, odvzetih po 14 dneh fermentacije CDM s kvasovko *C. stellata*. Maso proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA.
- PRILOGA C2: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradfordu v vzorcih, odvzetih po 43 dneh fermentacije CDM s kvasovko *C. stellata*. Maso proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA.
- PRILOGA D: Zadrževalni časi glukoze, fruktoze in zunajceličnih metabolitov (glicerol, etanol, očetna kislina) na koloni Aminex (BioRad).
- PRILOGA E1: Podatki za rastno krivuljo kvasovke *C. stellata* ZIM 1842, ki smo jo gojili v gojišču CDM s koncentracijo sladkorjev 20 g/l (10 g/l glukoze + 10 g/l fruktoze) (aerobna submerzna kultivacija na stresalniku, 25 ur, 200 vrt./min, 28 °C).
- PRILOGA E2: Podatki za rastno krivuljo kvasovke *C. stellata* ZIM 1842, ki smo jo gojili v gojišču CDM s koncentracijo sladkorjev 400 g/l (200 g/l glukoze + 200 g/l fruktoze) (aerobna submerzna kultivacija na stresalniku, 25 ur, 200 vrt./min, 28 °C).
- PRILOGA F: Poraba glukoze in fruktoze, sinteza etanola, glicerola in očetne kisline (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*) in so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.
- PRILOGA F1: Poraba glukoze (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.
- PRILOGA F2: Poraba fruktoze (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA F3: Sinteza etanola (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA F4: Sinteza glicerola (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA F5: Sinteza očetne kisline (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA G1: Relativna poraba glukoze pri fermentaciji gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA G2: Relativna poraba fruktoze pri alkoholni fermentaciji gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA H: Spreminjanje vrednosti pH v gojiščih CDM med alkoholno fermentacijo s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA I: Spreminjanje vrednosti OD₆₅₀ med alkoholno fermentacijo gojišč CDM zaradi rasti kvasovke *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so tudi vrednosti standardnih odklonov (SD) in koeficientov variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA J: Sinteza CO₂ (g) in dCO₂/dt (g/l/dan) med alkoholno fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata* (ZIM 1842). Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

PRILOGA K: Povprečne količine suhe biomase (g) ob inokulaciji in po 43-dnevni alkoholni fermentaciji gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so tudi vrednosti standardnih odklonov (SD) in koeficientov variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$A_{340/595/650}$	absorbanca pri valovni dolžini 340 nm oziroma 595 nm oziroma 650 nm
ADP	adenozin difosfat
AMP	adenozin monofosfat
ATP	adenozin trifosfat
a_w	vodna aktivnost
BSA	goveji serumski albumin (ang. <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
EMS	etil metan sulfonat
EMP pot	Embden-Meyerhof-Parnas – ova pot razgradnje glukoze; glikoliza
F6P	fruktoza-6-fosfat
F1,6P ₂	fruktoza-1, 6-bifosfat
F2,6P ₂	fruktoza-2, 6-bifosfat
G6P	glukoza-6-fosfat
GLK	glukokinaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
HXK	heksokinaza
KD (CD)	kemijsko definirano (ang. <u>C</u> hemically <u>D</u> efind)
KE	kolonijske enote (ang. CFU, <u>C</u> olony <u>F</u> orming <u>U</u> nit); število živih oziroma za razmnoževanje sposobnih mikroorganizmov, ki tvorijo kolonije
KV	koeficient variacije/variabilnosti
λ	valovna dolžina
NAD ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid (oksidirana oblika)
NADH + H ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid (reducirana oblika)
NADP ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (oksidirana oblika)
NADPH + H ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (reducirana oblika)
NH ₄ ⁺	amonijev ion
OD ₆₅₀	inteziteta prepuščene sipane svetlobe pri λ 650 nm (turbidnost, motnost); optična gostota (ang. <u>O</u> ptical <u>D</u> ensity)
p.a.	per analysis
P _i	ortofosfat (PO ₄ ³⁻)
PEP	fosfoenolpiruvat
PFK	fosfofruktokinaza
PYK	piruvat kinaza
R	faktor redčitve
SB	suha biomasa
SD	standardni odklon oziroma variacija
U	encimska enota (ang. Unit); količina encima, ki oksidira (reducira) 1 μ mol substrata v 1 minuti
vrt./min	vrtljaji na minuto
YM	gojišče s kvasnim in sladnim ekstraktom (ang. Yeast extract – Malt extract)
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete v Ljubljani

SLOVARČEK

Enološka fermentacija: Je delna ali popolna sprememba grozdnih sladkorjev glukoze in fruktoze v moštu v etanol, CO₂ in druge končne metabolite z alkoholno fermentacijo. Proces je skupek ekoloških in biokemijskih interakcij med različnimi vrstami kvasovk, bakterij, drugih gliv in njihovih virusov.

Grozni sok: Sveži sok, pridobljen s stiskanjem grozdnih jagod. Sladka, bistra in brezalkoholna tekočina.

Mošt: Delno fermentiran grozni sok z nizko vsebnostjo etanola. V njem nastaja ogljikov dioksid (CO₂) kot posledica anaerobnega metabolizma kvasovk.

Vino: O vinu govorimo po zaključeni alkoholni fermentaciji, ko je prenehal izhajati CO₂ kot posledica porabe sladkorjev ali zaradi nastanka etanola v koncentraciji približno 12 vol. %. V primeru zaustavitve alkoholne fermentacije, ko je koncentracija reducirajočih sladkorjev previsoka, ne moremo govoriti o vinu.

1 UVOD

Ključni proces v proizvodnji vina je alkoholna fermentacija, kompleksen biokemijski proces, ki vključuje interakcije med bakterijami, kvasovkami, ostalimi glivami in njihovimi virusi. Kvasovke porabljajo sladkorje in druge spojine iz grozdnega soka oziroma mošta in jih uporabljajo kot substrat za rast ter jih pretvarjajo v etanol, ogljikov dioksid (CO₂) ter druge končne produkte, ki prispevajo h kemijski sestavi in senzorični kvaliteti vina (Fleet in Heard, 1992). Na začetku spontane fermentacije prevladujejo kvasovke iz rodov *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* (*Candida stellata*), *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Pichia* in *Kluyveromyces* (Pretorius, 2002). Njihova rast in sodelovanje pri fermentaciji se po 2 ali 3 dneh zmanjšata, glavno vlogo pa prevzame vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, ki je odpornejša na višje koncentracije etanola in lahko zaključi fermentacijo (Romano in sod., 2003; Fleet in Heard, 1992).

Organoleptično so vina, ki nastanejo s fermentacijo združenih vrst kvasovk ali s spontano fermentacijo, bolj ocenjena kot vina, ki nastanejo s fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* ali z vzpodbujeno fermentacijo (Soden in sod., 2000). Kvasovke iz rodov *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Pichia* in *Kluyveromyces* namreč pozitivno vplivajo na aromo, okus in polnost vina (Mora in Mulet, 1991), saj sintetizirajo več glicerola, organskih kislin, višjih alkoholov, estrov, acetaldehida in drugih hlapnih snovi (Fleet in Heard, 1992; Romano in sod., 2003).

Vinarji se med proizvodnjo vina srečujejo z mnogimi izzivi. Zaradi raznih težav med samim postopkom se lahko zgodi, da končni izdelek ni primeren za prodajo. Temu so vzrok tudi upočasnjene in zaustavljene fermentacije (Henschke in Jiranek, 1992), katerih posledica so vina s preveliko vsebnostjo reducirajočih sladkorjev (Bisson, 1999). Vzroki za upočasnjene in zaustavljene fermentacije so različni. Med njimi je tudi prenizko razmerje med glukozo in fruktozo, dvema glavnima sladkorjema v moštu (Schütz in Gafner, 1993). Koncentraciji glukoze in fruktoze sta v grozdnem soku pred začetkom fermentacije običajno enaki (Berthels in sod., 2004), proti koncu fermentacije pa je lahko fruktoze tudi do 10-krat več (Gafner in Schütz, 1996). Znižanje razmerja glukoza/fruktoza (GF) v moštu pod vrednost 0,1 vedno upočasnji ali predčasno zaustavi fermentacijo (Schütz in Gafner, 1993). Vzroki za znižanje razmerja GF so lahko naslednji (Berthels in sod., 2004):

- prenos sladkorjev v kvasno celico,
- fosforilacija sladkorjev po vstopu v celico,
- razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih glukoze in fruktoze,
- razlike v zaznavanju glukoze in fruktoze,
- način vzdrževanja katabolne represije med fermentacijo glukoze in fruktoze,
- pomanjkanje hranil,
- inhibitorno delovanje višjih koncentracij etanola,
- osmotski stres zaradi povišanih koncentracij sladkorjev.

1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNA HIPOTEZA

Pogosto se zgodi, da pri proizvodnji vina pride do predčasne zaustavitve fermentacije. Nastanejo vina, ki vsebujejo previsoke koncentracije reducirajočih sladkorjev in prenizke koncentracije etanola. Potrebne so analize, ki bi razjasnile vzroke za te težave. Če bi lahko z analizo mošta pravočasno ugotovili nepravilen potek fermentacije, bi lahko preprečili njeno predčasno zaustavitev. Eden izmed razlogov je prenizko razmerje glukoza/fruktoza oziroma previsoka koncentracija fruktoze v moštu, ki lahko z različnimi mehanizmi vpliva na potek fermentacije.

Problematika fermentacije mošta v vino je najpogosteje preučevana s čisto kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Realno to pretvorbo opravi več vrst kvasovk, ki so v času fermentacije prisotne v moštu. Delovanje endogenih kvasovk, tudi kvasovke *Candida stellata*, lahko pomembno poseže v razvoj fermentacije pri spontanem bioprocesu.

Namen dela je bil ugotoviti vpliv kvasovke *C. stellata* na učinkovitost pretvorbe glukoze in fruktoze v etanol. To smo poskusili ugotoviti preko spremljanja porabe sladkorjev in nastajanja metabolnih produktov ter aktivnosti ključnih glikolitičnih encimov. Kot gojišče smo uporabili kemijsko definiran mošt z različnim začetnim razmerjem glukoze in fruktoze. V primerjavi s starševskim sevom smo testirali tudi fermentacijsko učinkovitost dveh mutant kvasovke *C. stellata*.

Delovna hipoteza:

- Kvasovka *Candida stellata* prednostno porablja fruktozo in s svojim delovanjem preprečuje preveliko znižanje razmerja glukoza/fruktoza, ki lahko povzroči predčasno zaustavitev fermentacije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 UPOČASNJENA (ang. »SLUGGISH«) IN ZAUSTAVLJENA (ang. »STUCK«) ENOLOŠKA FERMENTACIJA

Glavni cilj alkoholne fermentacije grozdnega soka je nastanek končnega produkta – vina. Vinarji se med samo proizvodnjo soočajo z različnimi izzivi, ki so pomembni tudi z ekonomskega stališča, saj lahko zaradi različnih razlogov končni izdelek izostane ali pa ni primeren za prodajo. Eden teh razlogov so tudi upočasnjene in predčasno zaustavljene fermentacije (Henschke in Jiranek, 1992). Upočasnjena fermentacija za doseg zahtevane nizke stopnje reducirajočih sladkorjev v vinu potrebuje več časa kot povprečna fermentacija, ki se običajno konča v 7 do 10 dneh. Hitrost fermentacije se zmanjša, ko se le-ta približuje koncu. Traja do enega meseca in več, sčasoma pa se lahko popolnoma zaustavi. Zaustavljena fermentacija je definirana kot tista, ki se predčasno zaustavi, zaradi česar je v končnem produktu koncentracija reducirajočih sladkorjev višja od zaželene. Vina s previsoko vsebnostjo sladkorja so dovzetnejša za mikrobiološki kvar in včasih tudi organoleptično nesprejemljiva. Do upočasnjenih ali zaustavljenih fermentacij privede veliko različnih vzrokov. Včasih delujejo istočasno in tako še povečajo svoj negativni vpliv na potek fermentacije (Bisson, 1999).

Najpogostejši vzrok za upočasnjene in zaustavljene fermentacije je pomanjkanje hranil, predvsem dušika (Munoz in Ingledew, 1989; Henschke in Jiranek, 1992; Fleet in Heard, 1992; Kunkee in Bisson, 1993; Bisson, 1999; Robinson, 1999; Berthels in sod., 2004), ki je potreben za sintezo in nemoteno delovanje proteinov v celicah (Salmon, 1989). Pomanjkanje dušika privede do zmanjšane rasti celic in do upočasnjene porabe ter metabolizma sladkorjev (Bisson, 1992; Henschke in Jiranek, 1992). To lahko preprečimo z dodatkom asimilirajočih dušikovih spojin v mošt na začetku fermentacije (Munoz in Ingledew, 1989; Carrau in sod., 1993; Ribéreau-Gayon in sod., 2000b; Berthels in sod., 2004).

Še en razlog za upočasnjene in zaustavljene fermentacije je lahko sinteza srednje dolgih maščobnih kislin. To so na primer heksanojska, oktanojska in dekanajska maščobna kislina (Lafon-Lafourcade in sod., 1984; Reed in Nagodawithana, 1988; Munoz in Ingledew, 1989; Edwards in sod., 1990; Fleet in Heard, 1992; Kunkee in Bisson, 1993). So naravni produkti metabolizma kvasovk med alkoholno fermentacijo (Edwards in sod., 1990). V nižjih koncentracijah za celice niso toksične (Fleet in Heard, 1992), če pa je njihova koncentracija v moštu povišana in hkrati delujejo istočasno s povišanimi koncentracijami etanola, lahko inhibirajo metabolizem in rast kvasovk (Lafon-Lafourcade in sod., 1984).

Temperatura okolja, v katerem živijo kvasovke, vpliva na celično membrano (predvsem na njeno fluidnost), citoplazemske proteine in na celične organele (njihovo strukturo in funkcijo) (Bisson, 1999). Vpliva tudi na hitrost rasti kvasovk in posledično na trajanje fermentacije, na obseg vpliva določene vrste ali seva kvasovk na fermentacijo in na biokemijske reakcije kvasovk, ki določajo kemijsko sestavo in senzorično kakovost vina (Fleet in Heard, 1992).

Med fermentacijo grozdnega soka oziroma mošta morajo vinarji paziti, da ne prihaja do prevelikih temperaturnih nihanj (Bisson, 1999), saj je prenizka ali previsoka temperatura lahko vzrok upočasnenih ali zaustavljenih fermentacij (Sharf in Margalith, 1983). Fermentacija je eksotermni proces, saj se toplota sprošča, zato se temperatura mošta med samim procesom lahko zviša tudi za 5 do 10 °C (Fleet in Heard, 1992). Pregrevanje mošta preprečujejo s hlajenjem, saj sočasnost visokih temperatur in etanola privede do inaktivacije in celo smrti fermentirajočih kvasovk (Sharf in Margalith, 1983; Reed in Nagodawithana, 1988; Bisson, 1999). Toksičnost etanola se povečuje z višanjem temperature (Dittrich, 1995; Charoenchai in sod., 1998) oziroma so kvasovke pri visokih temperaturah občutljivejše na vplive etanola (Gao in Fleet, 1988; Heard in Fleet, 1988; Fleet in Heard, 1992). Vendar težave povzroča tudi prenizka temperatura, saj zmanjša metabolno aktivnost kvasovk (Sharf in Margalith, 1983; Skaza, 1988; Lauzi, 1996; Ciani in Comitini, 2006).

Tudi nekatere tehnike, ki se uporabljajo v enološki dejavnosti, lahko privedejo do upočasnenih in zaustavljenih fermentacij. Takšna je na primer prekomerna uporaba žveplovega dioksida (SO₂), ki je toksičen predvsem za endogene vrste kvasovk (Gafner in Schütz, 1996; Bisson, 1999). Na to vpliva tudi bistrenje mošta (Edwards in sod., 1990; Fleet in Heard, 1992), ki lahko pomeni izgubo hranil, vitaminov in mineralov, zmanjšanje naravne sposobnosti mošta za mešanje (Bisson, 1999) in zmanjšanje števila endogenih kvasovk v grozdnem soku oziroma moštu (Mora in Mulet, 1991).

Dodatni vzroki za upočasnitev fermentacije so še prenizko razmerje glukoza/fruktoza, prisotnost »killer« in drugih mikrobnih toksinov, prisotnost fungicidov in pesticidov v moštu ter kompeticija med mikroorganizmi (Gao in Fleet, 1988; Reed in Nagodawithana, 1988; Drysdale in Fleet, 1989; Salmon, 1989; Edwards in sod., 1990; Fleet in Heard, 1992; Carrau in sod., 1993; Schütz in Gafner, 1993; Gafner in Schütz, 1996; Bisson, 1999; Robinson, 1999; Ribéreau-Gayon in sod., 2000a; Berthels in sod., 2004).

2.1.1. Vpliv razmerja glukoza/fruktoza (GF) na upočasnitev in prezgodnjo zaustavitev enološke fermentacije

Med raziskovanjem vzrokov za nastanek upočasnenih in zaustavljenih fermentacij so analizirali tudi količino preostalega sladkorja v vinu. Ugotovili so, da je koncentracija fruktoze na koncu fermentacije precej višja od koncentracije glukoze (Schütz in Gafner, 1993), kljub temu da je količina obeh sladkorjev v grozdnem soku na začetku procesa bolj ali manj enaka (Bisson, 1992; Berthels in sod., 2004). Pri upočasnenih ali zaustavljenih fermentacijah je bila vedno koncentracija fruktoze tudi do 10-krat višja od koncentracije glukoze (Gafner in Schütz, 1996). Na podlagi teh podatkov so sklepali, da mora obstajati povezava med razmerjem GF v moštu in upočasnenimi ter zaustavljenimi fermentacijami. To so dokazali z umetnim zniževanjem razmerja GF med fermentacijo. V mošt so tekom procesa dodali encim glukoza oksidazo ali mlečnokislinsko bakterijo *Leuconostoc oenos*. Encim glukoza oksidaza pretvarja glukozo v glukonsko kislino, ki je kvasovke ne morejo porabiti kot vir energije, *L. oenos* pa

porablja glukozo veliko hitreje kot fruktozo. Rezultati so pokazali, da znižanje razmerja GF v moštu pod vrednost 0,1 vedno upočasni ali predčasno zaustavi fermentacijo (Schütz in Gafner, 1993).

2.1.1.1 Možni vzroki za počasnejšo porabo fruktoze med fermentacijo mošta

Vzroke za znižanje razmerja GF pod vrednost, ki še omogoča normalen potek fermentacije mošta, lahko iščemo v prenosu sladkorjev in njihovi fosforilaciji po vstopu v celico, razlikah v fizikalno-kemijskih lastnostih glukoze in fruktoze, razlikah v zaznavanju glukoze in fruktoze, načinu vzdrževanja katabolne represije med alkoholno fermentacijo glukoze oziroma fruktoze, vplivu pomanjkanja hranil, inhibitornem delovanju višjih koncentracij etanola in osmotskem stresu zaradi povišanih koncentracij sladkorjev (Berthels in sod., 2004).

Kvasovka *S. cerevisiae* uporablja za prenos glukoze v celico tri prenašalne proteine: heksokinazo 1 (HXK1), heksokinazo 2 (HXK2) in glukokinazo (GLK) (Cartwright in sod., 1989; Bisson, 1999; Berthels in sod., 2004). Samo HXK1 in HXK2 prenašata tudi fruktozo (Bisson, 1992). Oba sladkorja se porabljata istočasno. To pomeni, da med seboj tekmujeta za vezavo na prenašalne proteine, vendar imajo le-ti večjo afiniteto do glukoze (Berthels in sod., 2004), kar se kaže v počasnejši porabi fruktoze iz mošta (Schütz in Gafner, 1993; Ribéreau-Gayon in sod., 2000b; Berthels in sod., 2004). Na začetku fermentacije je ta razlika precej majhna, v kasnejših fazah procesa pa se povečuje (Berthels in sod., 2004). Na podlagi raziskav sta Schütz in Gafner (1995) predlagala, da je vzrok za zmanjšan prenos fruktoze in nagnjenost k zaustavitvi fermentacije zmanjšana aktivnost transportnega encima HXK1.

Fosforilacija sladkorjev je lahko naslednji vzrok za počasnejšo fermentacijo fruktoze. V celici se glukoza fosforilira z encimi HXK1, HXK2 in GLK v glukoza-6-fosfat (G6P). Nato se s pomočjo encima glukoza-6-fosfat izomeraze pretvori v fruktoza-6-fosfat (F6P), ki se potem ob porabi ene molekule adenzin trifosfata (ATP) in aktivnosti encima fosfofruktokinaze (PFK) pretvori v fruktoza-1,6-bisfosfat (F1,6P₂) (Gancedo in Serrano, 1989; Ratledge, 2006). Fruktozo fosforilirata samo encima HXK1 in HXK2 (Gancedo in Serrano, 1989). Ob tem takoj nastane F6P, ki vstopi v glikolizo in se pretvori v F1,6P₂. V nasprotju z glukozo pri tem niso potrebni nobeni dodatni koraki (Walker, 1998; Nelson in Cox, 2000; Berthels in sod., 2004).

Nižjo afiniteto transportnega sistema za fruktozo lahko razložijo tudi razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih glukoze in fruktoze. Glukoza je aldoza in je v raztopini v piranozni obliki. Fruktoza je ketoza. V raztopini je le delno v furanozni obliki (Nelson in Cox, 2000), katero transportni sistem lažje prenaša. HXK lahko fosforilira samo furanozno obliko fruktoze, ker se piranozna oblika strukturno preveč razlikuje od glukoze (Gancedo in Serrano, 1989).

Asimilirajoče dušikove spojine preko sinteze proteinov vplivajo na skupno število celic in na potek metabolizma sladkorjev (Bisson, 1992). Znano je, da lahko dušik zmanjša negativni

učinek nekaterih vzrokov (na primer povišane koncentracije etanola v moštu), ki privedejo do upočasnenih in zaustavljenih fermentacij. Manj kot je asimilirajočih dušikovih spojin v moštu, več sladkorja ostane v vinu po končani fermentaciji (Salmon, 1989). Berthels in sodelavci (2004) so ugotovili, da dodatek asimilirajočega dušika v mošt tekom fermentacije pospeši porabo fruktoze bolj kot porabo glukoze. Dodani vir dušika prepreči razgradnjo heksoznih prenašalcev z višjo afiniteto za fruktozo.

Možen vzrok za počasnejšo porabo fruktoze med fermentacijo je tudi povišana koncentracija etanola v moštu. Berthels in sodelavci (2004) so med fermentacijo v mošt dodajali etanol in ugotovili, da je poraba fruktoze občutljivejša na višje koncentracije etanola kot pa poraba glukoze.

2.2 ENOLOŠKA FERMENTACIJA

Fermentacija grozdnega soka v vino je kompleksen biokemijski proces, ki vključuje interakcije med bakterijami, kvasovkami, ostalimi glivami in njihovimi virusi. Med enološko fermentacijo kvasovke porabljajo sladkorje in druge spojine iz grozdnega soka oziroma mošta, jih uporabljajo kot substrat za rast ter jih pretvarjajo v etanol, CO₂ ter druge končne produkte, ki prispevajo h kemijski sestavi in senzorični kakovosti vina (Fleet in Heard, 1992; Pretorius, 2002).

2.2.1 Tradicionalna in sodobna proizvodnja vina

Največjo vlogo pri alkoholni fermentaciji v proizvodnji vina imajo kvasovke (Pretorius, 2002). Te se nahajajo na površini grozdja in na vinarski opremi, od koder med postopki obiranja in obdelave grozdja prehajajo v grozdni sok oz. mošt, lahko pa jih dodajo kot inokulum (Fleet in Heard, 1992; Pretorius, 2002).

V tradicionalni tehnologiji proizvodnje vina fermentacijo vodijo kvasovke, ki so večinoma na površini grozdnih jagod in vinarske opreme. Takšna fermentacija je spontana, traja mnogo dlje kot vzpodbujena fermentacija in je dosti bolj nepredvidljiva (Pretorius, 2002).

V sodobni tehnologiji proizvodnje vina moštu dodajo vcepke izbranih sevov kvasovke *S. cerevisiae*, ki jo imenujemo tudi vinska kvasovka. Vzpodbujena fermentacija je hitra, učinkovita in bolj predvidljiva, daje po okusu in vonju skladen končni produkt, omogoča popolnejšo pretvorbo sladkorjev v etanol, dodatek vcepka pa tudi skrajša fazo prilagajanja kvasovk na mošt (Heard in Fleet, 1985; Fleet in Heard, 1992; Pretorius, 2002; Raspor in sod., 2002).

2.2.1.1 Kvasovke pri tradicionalni in sodobni proizvodnji vina

50 do 70 % kvasovk, ki jih najdemo na površini grozdnih jagod, spada v rodova *Kloeckera* in *Hanseniaspora*. Po številčnosti jim sledijo kvasovke iz rodov *Candida* (predvsem vrsti *C. stellata* in *C. pulcherrima*), *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kluyveromyces* in *Hansenula* (Fleet in Heard, 1992; Pretorius, 2002). Kvasovka *S. cerevisiae* številčno prevladuje na vinarski opremi in na kletnih površinah (Rosini, 1984; Fleet in Heard, 1992; Pretorius, 2002). Na površini grozdja je prisotna v zelo majhnem številu, običajno premajhnem, da bi jo lahko izolirali z metodami direktnega gojenja na ploščah (Heard in Fleet, 1985; Fleet in Heard, 1992; Combina in sod., 2005; Raspor in sod., 2006).

Čeprav je na grozdju in vinarski opremi prisotnih veliko različnih vrst kvasovk, lahko pri fermentaciji sodelujejo le nekatere med njimi (Romano in sod., 2003). Na začetku spontane fermentacije prevladujejo kvasovke *Kloeckera*, *Hanseniaspora* in *Candida* (Heard in Fleet, 1985; Fleet in Heard, 1992; Pretorius, 2002; Romano in sod., 2003). Pozneje se jim pridružijo še druge kvasovke iz rodov *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Pichia* in *Kluyveromyces* (Pretorius, 2002). Njihova rast in sodelovanje pri fermentaciji se po 2 ali 3 dneh zmanjšata. Pri celotni fermentaciji sodelujejo tudi kvasovke vrste *S. cerevisiae*, ki so na začetku prisotne v majhnem številu. Ko je vsebnost etanola v moštu med 5 in 6 %, kvasovke iz rodov *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Pichia* in *Kluyveromyces* propadejo. Posledično se bolj razmnožijo kvasovke *S. cerevisiae*, ki so odpornejše na visoke koncentracije etanola in zaključijo fermentacijo (Pardo in sod., 1989; Fleet in Heard, 1992; Charoenchai in sod., 1998; Pretorius, 2002; Romano in sod., 2003; Combina in sod., 2005).

Kvasovke *S. cerevisiae*, ki jih dodajo kot vcepek, prevladujejo med fermentacijo. Kmalu po nacepljanju naj bi zavrle in preprečile rast endogenih kvasovk, prisotnih na površini grozdnih jagod in vinarske opreme. Vendar so zadnje raziskave na tem področju pokazale ravno nasprotno. Čeprav so moštu dodali selekcionirane kvasovke *S. cerevisiae*, so endogene kvasovke še naprej rasle, sodelovale in vplivale na fermentacijo, dokler niso propadle zaradi previsoke koncentracije etanola. To je veljalo predvsem za vrsti *Kloeckera apiculata* in *C. stellata*, ki sta se razmnožili tudi do 10^6 ali 10^7 CFU/ml (Colony Forming Unit/ml). To pomeni, da sta pomembno prispevali k sami fermentaciji in s svojimi kemijskimi produkti ter rastjo vplivali tudi na rastno kinetiko nacepljene kvasovke *S. cerevisiae* (Heard in Fleet, 1985; Fleet in Heard, 1992). Podobno so ugotovili tudi Constanti in sodelavci (1997). V prvih treh dneh fermentacije sta kvasovki *C. stellata* in *Hanseniaspora uvarum* predstavljali 95 % populacije, po petih dneh fermentacije pa še vedno 10 %. Ostali odstotek populacije so predstavljali edogeni in nacepljeni sevi kvasovke *S. cerevisiae*.

2.2.1.2 Uporaba čistih in združenih kvasnih kultur kot vcepek pri proizvodnji vina

Že nekaj desetletij se predvsem zaradi odpravljanja težav s fermentacijo in zaradi lažjega obvladovanja in napovedovanja poteka fermentacije pri proizvodnji vina uporablja vcepek

čistih kvasnih kultur. Le-ta je negativno vplival na senzorično nekaterih vin. Vsaka kvasna vrsta, ki sodeluje pri fermentaciji, ima namreč značilne metabolne lastnosti, kar pomeni, da vsaka vrsta vpliva na sestavo vina s svojimi posebnimi metabolnimi produkti ali pa vsaj z njihovo količino (Romano in sod., 2003).

Čeprav nekateri avtorji še vedno dajejo prednost fermentaciji mošta s čistimi kulturami selekcioniranih kvasovk, predvsem vrste *S. cerevisiae* (Dittrich, 1995; Klenar, 2002), so zadnja leta za inokulacijo mošta začeli preizkušati in priporočati združene kulture kvasovk (Mateo in sod., 1991; Soden in sod., 2000; Povhe-Jemec, 2003; Rojas in sod., 2003; Ciani in sod., 2006). Organoleptično so bila vina, ki so nastala s fermentacijo združenih vrst kvasovk ali s spontano fermentacijo, boljše ocenjena kot vina, ki so nastala s fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* ali z vzpodbujeno fermentacijo (Soden in sod., 2000; Raspor in sod., 2002; Povhe Jemec, 2003). Endogeni rodovi kvasovk namreč pozitivno vplivajo na kakovost vina (Heard in Fleet, 1985; Mora in Mulet, 1991; Domizio in sod., 2007) zaradi sinteze višjih koncentracij glicerola, organskih kislin, višjih alkoholov, estrov, acetaldehida in drugih hlapnih snovi, ki so glavne komponente arome, okusa in polnosti vina (Edwards in sod., 1990; Fleet in Heard, 1992; Romano in sod., 1997; Pretorius, 2002; Tóth-Markus in sod., 2002; Romano in sod., 2003).

2.2.1.2.1. Uporaba kvasovke *Candida stellata* v združenih kulturah s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*

Za združene kulture je poleg ostalih kvasovk zanimiva tudi vrsta *C. stellata* (Ciani in Comitini, 2006). V večjem številu jo najdemo na površini grozdja in na vinarski opremi, od koder med stiskanjem preide v mošt in sodeluje pri njegovi fermentaciji (Mora in sod., 1988; Fleet in Heard, 1992; Župec, 1998; Mavc, 2000; Kastelec, 2001; Povhe Jemec in sod., 2001; Raspor in sod., 2002; Clemente-Jimenez in sod., 2004; Jolly in sod., 2006). Za uporabo v združeni kulturi s kvasovko *S. cerevisiae* je primerna in zanimiva zaradi treh pomembnih lastnosti. Je fruktofilna kvasovka. Proizvaja višje koncentracije glicerola in nižje koncentracije očetne kisline (Benda, 1988; Ciani in Picciotti, 1995; Ciani in Ferraro, 1996; Ferraro in sod., 2000; Soden in sod., 2000; Povhe Jemec, 2003; Berthels in sod., 2004; Ciani in Comitini, 2006).

Če ima *C. stellata* v gojišču na razpolago glukozo in fruktozo, raje porablja fruktozo (Soden in sod., 2000; Berthels in sod., 2004). Ta njena lastnost je lahko pomembna v združeni kulturi s kvasovko *S. cerevisiae*, ki iz mošta raje porablja glukozo. Če mošt nacepijo s čisto kulturo *S. cerevisiae*, lahko to privede do znižanja razmerja GF do te mere, da se fermentacija upočasni ali popolnoma zaustavi, posledica pa je lahko izpad izdelka (Jolly in sod., 2006). Kvasovka *S. cerevisiae* namreč ni sposobna fermentirati, če je razmerje GF manjše kot 0,1 (Gafner in Schütz, 1996). Če bi torej v mošt dodali vcepek z združenima vrstama *C. stellata* in *S. cerevisiae*, do tega pojava ne bi prišlo, saj bi *C. stellata* porabljala fruktozo in tako preprečila znižanje razmerja GF pod 0,1 (Povhe Jemec, 2003; Jolly in sod., 2006). Z združenimi

kulturami *S. cerevisiae* in *C. stellata* bi lahko preprečili tudi nezaželeno sladkost suhih vin, ki je običajno posledica preostanka fruktoze v vinu (Berthels in sod., 2004).

Glicerol je pomemben končni produkt fermentacije. Po nastali količini je v vinu takoj za etanolom in CO₂. Ne prispeva toliko k aromi kot k izboljšanju vinskega telesa oziroma povečanju viskoznosti (Ciani in Ferraro, 1996; Ribéreau-Gayon in sod., 2000b). To da vinu večjo polnost (Bavčar, 2006). Kemijsko je glicerol 1,2,3-propantriol – prozorna, hidroskopna, sladka snov brez vonja (Yalçın in Özbas, 2004). *C. stellata* ga proizvede med 10 in 14 g/l (Ciani in Picciotti, 1995; Ciani in Ferraro, 1996), medtem ko ga *S. cerevisiae* proizvede le približno 7 g/l (Ciani in Ferraro, 1996; Prpar, 2006).

C. stellata sintetizira malo očetne kisline (Ciani in Picciotti, 1995; Ciani in Ferraro, 1996). Ta v vinu ne sme biti prisotna v prevelikih koncentracijah, saj ima zaradi svojega ostrega okusa negativne vplive na senzorične lastnosti končnega produkta (Bisson, 1992; Nemanič, 1996).

Glavno težavo pri združenih kulturah, ki se uporabljajo za nacepljanje mošta, predstavlja kvasovka *S. cerevisiae*, ki je sposobna hitrejših fermentacij in razmnoževanja kot druge vrste kvasovk. Slednje običajno nimajo niti možnosti, da bi se razmnožile do te mere, da bi lahko prispevale pomembnejše količine snovi, pomembnih za okus in armo vina (Mateo in sod., 1991). Zaradi tega preizkušajo sočasne fermentacije z dvema ali več vrstami kvasovk, pri čemer pustijo kvasovkam, ki niso iz rodu *Saccharomyces*, nekaj časa, da fermentirajo, potem pa dodajo čisto kulturo *S. cerevisiae*. Ta postopek omogoča nastanek vin z boljšo in bolj kompleksno armo ter okusom (Romano in sod., 2003). To so ugotovili tudi Soden in sodelavci (2000), ko so preizkušali sočasno fermentacijo kvasovk *C. stellata* in *S. cerevisiae*. Zanimiva je tudi uporaba pritrjenih kvasovk *C. stellata* v kombinaciji s prostimi kvasovkami *S. cerevisiae* (Ciani in Ferraro, 1996; Ciani in Ferraro, 1998; Ferraro in sod., 2000; Ciani in Comitini, 2006). Pritrditev zagotavlja večjo koncentracijo biomase in posledično hitrejši potek reakcij (Ferraro in sod., 2000). Pritrjene kvasovke *C. stellata* so bile tekom fermentacije manj občutljive na zunanje vplive in metabolno bolj aktivne. Proizvedle so tudi višje koncentracije glicerola kot proste celice (Ciani in Ferraro, 1996; Ciani in Comitini, 2006).

Vendar kvasovka *C. stellata* ni primerna za samostojno fermentacijo mošta, ker proizvede premalo etanola, in sicer samo med 4 in 7 % (Ciani in Ferraro, 1996). To ni dovolj za nastanek vina, saj mora le-to vsebovati najmanj 8,5 % etanola (Šikovec, 1996).

2.2.2 Kinetika rasti kvasovk med alkoholno fermentacijo

Med fermentacijo mošta se populacija kvasovk poveča z 10⁴-10⁶ CFU/ml na 10⁸-10⁹ CFU/ml. Kinetika rasti sledi tipični rastni krivulji mikroorganizmov v zaprtem sistemu, ki jo lahko razdelimo na fazo prilagajanja, eksponentno fazo rasti, stacionarno fazo rasti in fazo odmiranja celic (Bisson, 1992; Fleet in Heard, 1992; Combina in sod., 2005). Opišemo jo z naslednjimi parametri: trajanje faze prilagajanja, hitrost rasti, maksimalno število celic v populaciji in

trajanje stacionarne faze rasti in faze odmiranja. Ti parametri se v odvisnosti od različnih faktorjev, kot so na primer bistrenje grozdnega soka, dodatek SO₂, temperatura fermentacije, sestava grozdnega soka, nacepljanje s selekcioniranimi kvasovkami in interakcija kvasovk z drugimi mikroorganizmi, razlikujejo od fermentacije do fermentacije (Fleet in Heard, 1992). Veliko etanola se sintetizira med stacionarno fazo rasti. Sladkor, ki se porabi v tem času, je predvsem vir energije in ne toliko vir ogljika za nastajanje biomase, saj se kvasovke v stacionarni fazi ne delijo več tako intenzivno (Bisson, 1992). Primarni produkt tega energetskega metabolizma je torej etanol (Özilgen in sod., 1991). Poleg etanola v stacionarni fazi nastajajo tudi večje količine sekundarnih metabolitov, kot so na primer acetaldehid, estri in višji alkoholi, ki določajo organoleptične lastnosti vina. Eksponentna faza traja samo nekaj dni, nato preide v stacionarno fazo (Fleet in Heard, 1992).

2.3 GROZDNI SOK

Kemijska sestava in senzorične lastnosti vina so rezultat različnih faktorjev, ki vključujejo sorto, geografske in vitikulturene pogoje rasti, mikrobnou ekologii površine grozdja, proces fermentacije in vinarsko prakso. Mikroorganizmi imajo preko procesa fermentacije izrazit vpliv na končno sestavo in senzorične lastnosti vina (Fleet, 2003). Nekatere snovi, ki so prisotne v grozdju, se lahko pretvorijo v aromatične spojine samo ob pomoči kvasnega metabolizma. Če hočemo proizvesti kakovostno vino, moramo upoštevati tudi sestavo posameznega mošta in izbiro seva kvasovke za vzpodbujeno fermentacijo. Iz moštov, ki se po kemijski sestavi med seboj razlikujejo, enaka vrsta ali sev kvasovke namreč proizvede različna vina (Romano in sod., 2003). Različni končni produkti nastanejo tudi, če za fermentacijo istega mošta uporabijo različne vrste ali seve kvasovk (Cabrera in sod., 1988).

2.3.1 Sestava grozdnega soka

Grozdni sok oziroma mošt je primeren substrat za rast kvasovk, saj v večini primerov vsebuje vse potrebne sestavine za dokončanje fermentacije (Henschke in Jiranek, 1992). Njegova sestava se spreminja glede na sorto grozdja, sestavo in stanje prsti, klimo, uporabo gnojil in pesticidov, zrelost grozdja ob trgatvi in vinarske postopke, kot sta stiskanje grozdja in bistrenje mošta (Bisson, 1992; Fleet in Heard, 1992).

2.3.1.1 Sladkorji

Sladkorji so v grozdnem soku prisotni v koncentracijah od 140 do 260 g/l (Bisson, 1992). Vsebnost sladkorjev se povečuje sorazmerno z zrelostjo grozdja. Glavna sladkorja v grozdnem soku sta glukoza in fruktoza, ki nastaneta ob hidrolizi saharoze, zaradi česar sta oba monosaharida pred fermentacijo prisotna v enaki koncentraciji (Bisson, 1992; Kunkee in Bisson, 1993). Saharoza je prisotna samo v sledih, saj se tekom zorenja v grozdnih jagodah

cepi na prej omenjena monosaharida. V nizkih koncentracijah so prisotne tudi pentoze, ki jih kvasovke običajno ne porabljajo kot substrat (Bisson, 1992).

Previsoka koncentracija sladkorjev lahko podaljša fazo prilagajanja in zmanjša hitrost rasti kvasovk ter zmanjša maksimalno koncentracijo celic in toleranco na etanol v poznejših fazah fermentacije (Charoenchai in sod., 1998). Rast kvasovke *S. cerevisiae* se upočasni, če koncentracija sladkorjev preseže 200 g/l. Za kvasovko *C. stellata* pa predvidevajo, da bolje raste pri višjih koncentracijah sladkorjev (Fleet in Heard, 1992).

2.3.1.2 Dušik

Asimilirajoči dušik je esencialno hranilo, ki je kritično za fermentacijsko učinkovitost, in ki pogosto postane limitni faktor med samo fermentacijo (Berthels in sod., 2004). Najpomembnejši vir dušika so proste aminokisliline (prolin, arginin, alanin, glutamat, glutamin, serin in treonin) in amonijeve ioni (NH_4^+). Dušik je tudi sestavni del vitaminov, nukleotidov in nitratov. Vsebnost dušikovih komponent v grozdnem soku niha glede na vinorodni okoliš, vinogradniško prakso, sorto grozdja, zrelost grozdja ob trgatvi in tehnološki proces predelave grozdja med 60 in 2400 mg N/l. Za zadovoljivo hitrost fermentacije kvasovke potrebujejo vsaj 140 mg N/l (Henschke in Jiranek, 1992).

Dušik vpliva na število celic in regulira pretok ogljikovih spojin pri glikolizi, kar vpliva na metabolizem sladkorjev in na sam potek fermentacije (Bisson, 1992). Potreba po dušiku se običajno povečuje s povečevanjem koncentracije sladkorjev v grozdnem soku, je pa odvisna tudi od vrste in seva kvasovke (Fleet in Heard, 1992). Vsebnost dušika v grozdnem soku se lahko precej zmanjša s postopki predelave grozdja ali zaradi temperaturnih nihanj tekom predelave (Henschke in Jiranek, 1992). Pomanjkanje dušika privede do zmanjšane rasti kvasovk in do upočasnjene metabolizma sladkorjev. Posledica so lahko upočasnjene in zaustvaljene fermentacije (Salmon, 1989; Henschke in Jiranek, 1992).

2.3.1.3 Ostale komponente

Grozdni sok poleg sladkorjev in dušikovih spojin vsebuje dovolj fosfatov, vitaminov, mineralov in drugih elementov, ki jih kvasovke potrebujejo za rast. Prisotni so tudi steroli in nenasičene maščobne kisline (Bisson, 1992).

PH vrednost grozdnega soka variira med 3,0 in 4,0 in je odvisna predvsem od koncentracije vinske in jabolčne kisline (Bisson, 1992; Fleet in Heard, 1992). Kvasovke, ki niso iz rodu *Saccharomyces*, imajo pri vrednosti pH 3,5 večjo hitrost fermentacije kot pri pH 3,0 (Fleet in Heard, 1992).

Grozdni sok vsebuje tudi komponente, ki spremenijo, zavirajo ali ustavijo rast kvasovk. Okrog trdnih delcev, kot so na primer ostanki pecljev, pešk in kožic grozdnih jagod, se razvijejo biofilmi. Kvasne celice, ki jih tvorijo, imajo verjetno drugačne metabolne lastnosti od prostoživečih. Dodatek SO₂ podaljša fazo prilagajanja kvasovk, upočasnijo hitrost rasti, podaljša čas fermentacije in pospeši stacionarno fazo ter fazo odmiranja. Na vrste in seve kvasovk, ki sodelujejo pri fermentaciji, ima različen vpliv (Fleet in Heard, 1992). SO₂ ni vplival na rast kvasovke *S. cerevisiae*, zaustavil pa je rast drugih kvasovk, ki niso bile iz rodu *Saccharomyces* (Rosini, 1984). Ker SO₂ spremeni fermentativno kvasno populacijo, so vina, ki nastanejo iz grozdnega soka z dodatkom SO₂, drugačna (Fleet in Heard, 1992). V grozdnem soku so lahko prisotni tudi nekateri fungicidi in insekticidi, ki so jih uporabljali pri zaščiti vinograda. Nekatere od teh snovi lahko upočasnijo hitrost rasti kvasovk, podaljšajo čas prilagajanja ali pa kvasovke uničijo (Fleet in Heard, 1992; Kunkee in Bisson, 1993; Dittrich, 1995).

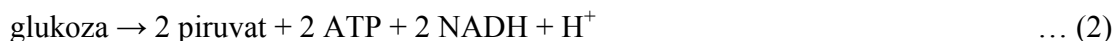
2.4 ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Fermentacija je oksidacijsko-redukcijski proces, pri katerem se ogljik iz iste organske spojine delno oksidira in delno reducira. Zunanji akceptor elektronov ni potreben (Madigan in sod., 2003). Alkoholna fermentacija je najpomembnejša reakcija pri proizvodnji vina (Fleet in Heard, 1992), saj je pretvorba grozdnih sladkorjev glukoze in fruktoze v etanol in CO₂ osrednjega pomena pri tem procesu (Bisson, 1992). Walker (1998) je povzel alkoholno fermentacijo z naslednjo enačbo:

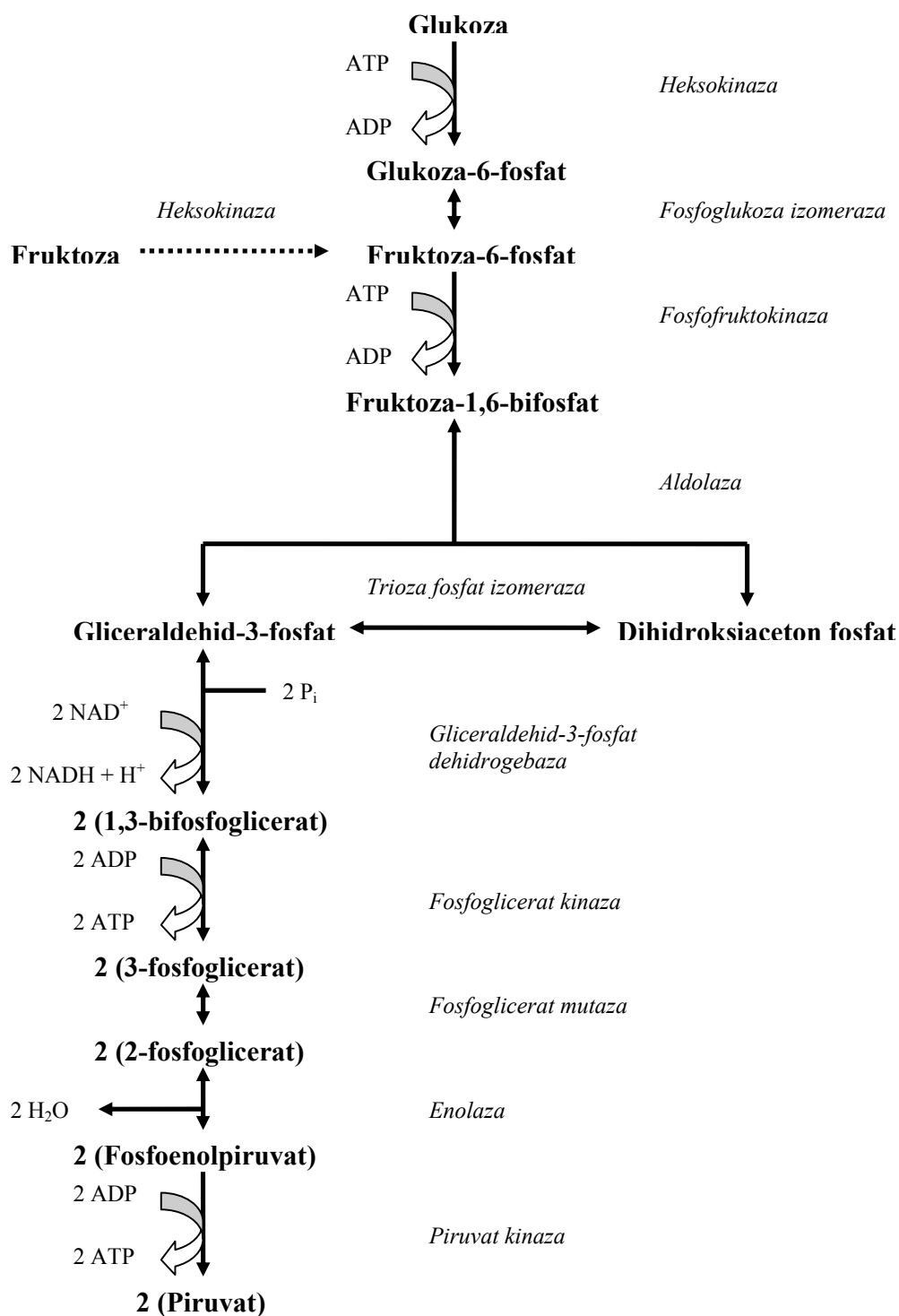


2.4.1 Glikoliza in metabolizem piruvata v etanol

Glikolizo lahko smatramo kot zaporedje korakov, ki vodijo od glukoze (fruktoze) do piruvata (Bisson, 1992). Običajna pot glikolize je Embden-Meyerhof-Parnasova pot (EMP) (Gancedo in Serrano, 1989). Razdelimo jo lahko na dva dela. V prvem delu se molekula glukoze (fruktoze) preoblikuje v gliceraldehid-3-fosfat. Redoks reakcije še ne potečejo, porabita pa se dve molekuli ATP. V drugem delu potečejo redoks reakcije. Nastanejo štiri molekule ATP in dve molekuli piruvata, dve molekuli nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD⁺) pa se reducirata v NADH + H⁺ (Walker, 1998; Madigan in sod., 2003). Walker (1998) je povzel glikolizo z naslednjo enačbo:



Podrobnejši potek glikolize po EMP poti je predstavljen na sliki 1.



Slika 1: Potek glikolize po EMP poti (Gancedo in Serrano, 1989; Walker, 1998; Ratledge, 2006).

Po glikolizi sledi nadaljnja oksidacija piruvata. V aerobnih pogojih se oksidira v ciklusu citronske kisline (CCK), v anaerobnih pogojih pa poteče alkoholna fermentacija (Bisson, 1992). Encim piruvat dekarboksilaza od piruvata odcepi molekulo CO₂, ki se ob tem pretvori v acetaldehid, katerega alkohol dehidrogenaza ob hkratni reoksidaciji NADH + H⁺ nazaj v NAD⁺ pretvori v etanol (Bisson, 1992; Ribéreau-Gayon in sod., 2000a; Ratledge, 2006).

2.4.2 Uravnavanje glikolize

2.4.2.1 Transport in fosforilacija sladkorjev (heksokinaza (HXK))

Molekule sladkorjev lahko vstopijo v kvasno celico na tri načine: z enostavno difuzijo, s pospešeno difuzijo ali z aktivnim transportom. Glukoza, fruktoza in manoza vstopajo v celico s pospešeno difuzijo. Predvidevajo, da je transport sladkorjev ključni korak v glikolizi, ki omogoča nadzor glikolitičnega toka v anaerobnih pogojih (Bisson, 1992; Cortassa in Aon, 1997; Gonçalves in Planta, 1998; Dequin in sod., 2003).

Glukoze in fruktoze v celico transportirajo isti prenašalci. Razdelimo jih lahko na visoko in nizko afinitetne (Berthels in sod., 2004). Nizko afinitetni prenašalci so inducirani, visoko afinitetni prenašalci pa inhibirani z glukozo, kar pomeni, da pri visokih koncentracijah glukoze niso aktivni. Ta pojav imenujemo katabolna represija (Cartwright in sod., 1989; Gancedo in Serrano, 1989; Salmon, 1989; Rolland in sod., 2001). Pri katabolni represiji z glukozo je ključnega pomena encim HXK2, pri katabolni represiji s fruktozo pa sta encima HXK1 in HXK2 enako pomembna (Moreno in Herrero, 2002; Berthels in sod., 2004).

Za prenos sladkorja v celico je najprej potrebna zaznava in nato vezava sladkorne molekule na transportni protein. Po vezavi sledi prepoznavanje substratne molekule s strani prenašalca, ki mora imeti za to v svoji strukturi poseben mehanizem. Za visoko afinitetne transportne proteine, ki so aktivni ob nizkih koncentracijah substrata, predvidevajo, da imajo na svoji površini več vezavnih mest. To bi jim naj omogočalo lažje prepoznavanje substrata, lahko pa privede tudi do substratne inhibicije, če pride do kompeticije med dvema molekulama substrata. Fruktoza lahko na ta način kompetitivno inhibira transport glukoze, saj kvasovke uporabljajo enake transportne proteine za oba sladkorja. Ob visokih koncentracijah substrata so torej aktivnejši nizko afinitetni transportni proteini, ki imajo bolj zaprto strukturo oziroma manj vezavnih mest za substrat (Bisson, 1999). HXK2 je nizko afinitetni encim, ki je aktiven med eksponentno fazo rasti v mediju z visoko koncentracijo sladkorjev, medtem ko je HXK1 visoko afinitetni encim, je delno zavrt z glukozo in postane aktiven komaj v stacionarni fazi rasti (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a), ko je koncentracija glukoze v mediju manjša (Dequin in sod., 2003).

Naslednji korak pri glikolizi je fosforilacija sladkorjev. Pri kvasovkah *Saccharomyces* jo lahko katalizirajo trije encimi: HXK1, HXK2 in GLK (Moreno in Herrero, 2002). Vsi trije encimi fosforilirajo glukozo, samo HXK1 in HXK2 pa lahko fosforilirata tudi fruktozo. HXK1 ima celo večjo afiniteto do fruktoze (Gancedo in Serrano, 1989; Berthels in sod., 2004). HXK1 se

ne sintetizira, dokler so v mediju prisotne visoke koncentracije glukoze. Zato postane aktiven proti koncu fermentacije, v stacionarni fazi rasti. Razmerje med fosforilacijo molekul glukoze in fruktoze je 1:3. HXK2 se izraža konstitutivno med eksponentno fazo rasti. Razmerje med fosforilacijo molekul glukoze in fruktoze je 1:1 (Bisson, 1992; Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

2.4.2.2 Fosfofruktokinaza (PFK)

PFK je eden izmed glavnih encimov glikolize (Boze in sod., 1995; Walker, 1998). Katalizira drugi ireverzibilni korak v tem procesu, in sicer fosforilacijo F6P v F1,6P₂ (Walker, 1998). Je regulatorni encim, katerega aktivnost je modulirana s številnimi alosteričnimi efektorji, kot so na primer adenzin monofosfat (AMP), ADP, ATP, ortofosfat (P_i), F6P, F1,6P₂, fruktoza-2,6-bifosfat (F2,6P₂) in NH₄⁺ (Gancedo in Serrano, 1989; Bisson, 1992). Hitrost pretoka intermediatov skozi reakcije glikolize se spreminja v skladu z oscilirajočim spreminjanjem aktivnosti glikolitičnih encimov. Encim PFK je aktiviran z AMP, NH₄⁺, P_i, F6P in F1,6P₂, ATP pa nanj deluje inhibitorno. Ko je v okolju dovolj substrata (glukoze in fruktoze), so koncentracije F6P visoke. Takrat je PFK visoko aktiven. Poraba ATP je povečana zaradi fosforilacije F6P. Posledično se povečajo koncentracije ADP in AMP, ki stimulatorno delujeta na piruvat kinazo (PYK). PYK ob defosforilaciji fosfoenolpiruvata (PEP) tvori ATP in tako poveča njegovo koncentracijo. Glikolitični pretok je povečan. Razmerje ATP/AMP se poveča, koncentracija F6P se zaradi visoke aktivnosti PFK zmanjša, kar privede do inhibicije PFK, povečano razmerje ATP/ADP pa inhibira PYK. Glikolitični pretok se zmanjša. Posledica zmanjšanja aktivnosti PFK je ponovna akumulacija F6P in ko je njegova koncentracija dovolj visoka, se aktivnost PFK spet poveča (Gancedo in Serrano, 1989; Bagyan in sod., 2005). Na potek glikolize torej močno vplivajo koncentracije ATP in AMP. ATP preko negativne povratne zanke skrbi, da aktivnost PFK ni previsoka in da je količina proizvedene energije na primernem nivoju (Bagyan in sod., 2005).

2.4.2.3 Piruvat kinaza (PYK)

Zadnji ireverzibilni korak glikolize katalizira encim PYK (Gancedo in Serrano, 1989), ki pretvori PEP in ADP v piruvat in ATP (Jurica in sod., 1998). Vključen je v celostno kontrolo glikolize in reguliran s številnimi alosteričnimi efektorji: F1,6P₂, NH₄⁺, ATP in alanin. Dovolj visoke količine produkta PFK F1,6P₂ ga aktivirajo, inhibirajo pa ga višje koncentracije ATP (Bisson, 1992; Gonçalves in Planta, 1998; Jurica in sod., 1998; Taber in sod., 1998).

2.4.3 Stresni dejavniki med alkoholno fermentacijo

Kvasne celice so v okolju, kjer živijo, izpostavljene različnim zunanjim vplivom, ki se ves čas spreminjajo. Zato so tekom evolucije razvile mehanizme, ki jim pomagajo, da se tem

spremembam prilagajajo (Hohmann, 1997). Za to skrbijo različni senzorski sistemi, poti prenosa signala in predvsem proteini HSP (ang. Heat Shock Proteins). Med alkoholno fermentacijo so kvasovke podvržene osmotskemu stresu zaradi visokih koncentracij sladkorjev v moštu, etanolnemu stresu zaradi visokih koncentracij etanola, protimekrobnemu stresu zaradi snovi, ki jih dodajajo v mošt tekom fermentacije (na primer SO_2), stresu zaradi temperaturnih nihanj med samo fermentacijo in stresu zaradi pomanjkanja nekaterih hranil (na primer dušika). Vse to zmanjša hitrost rasti, stopnjo preživetja kvasovk in tudi učinkovitost fermentacije (Querol in sod., 2003).

2.4.3.1 Osmotski stres in sinteza glicerola

Kvasovke so med fermentacijo mošta izpostavljene visokim koncentracijam sladkorjev. Pri proizvodnji desertnih vin lahko te koncentracije dosežejo tudi do 50 % (w/v). Pod takšnimi pogoji se spremeni izražanje več kot 500 različnih genov, povezanih z osmotskim stresom (Erasmus in sod., 2003). Osmoregulatorni odziv pri kvasovki *S. cerevisiae* je dobro preučen. Regulirata ga HOG (ang. High Osmolarity Glycerol) pot in RAS-cAMP pot v povezavi s kaskado proteinskih kinaz, imenovano MAP (ang. Mitogen Activated Protein)-kinazna pot (Hohmann, 1997; Nevoigt in Stahl, 1997; Tamás in sod., 2000). Poveča se izražanje glikolitičnih genov, na primer HXK in GLK (Nevoigt in Stahl, 1997) in genov, ki so vpleteni v pot pentoze fosfata (PPP), ki verjetno služi kot ponor G6P in F6P iz procesa glikolize. Poveča se tudi izražanje genov, odgovornih za sintezo očetne kisline iz acetaldehida, in genov za sintezo sukcinata iz glutamata. Pride tudi do negativne regulacije genov, vpletenih v biosintezo celičnih komponent (Erasmus in sod., 2003).

Povišana koncentracija sladkorjev in posledično zmanjšana vodna aktivnost (a_w) v moštu pomeni za kvasovke hiperosmotski stres, kar zmanjša turgorski pritisk na celično steno (turgorski stres). Iz celic izstopi voda (vodni stres), kar povzroči krčenje celic (Hohmann, 1997; Tamás in sod., 2000; Martínez de Marañón in sod., 2001). Celice zmanjšujejo osmotski stres s kopičenjem kompatibilnih topljencev. To so spojine, ki se lahko kopičijo v celicah v visokih koncentracijah, vendar kljub temu ne vplivajo na fiziološke in biokemijske procese. Ne povzročajo inhibicije ali inaktivacije encimov. To so lahko ioni, sladkorji, polioli, aminokisliline in njihovi derivati. Celice jih lahko sintetizirajo same ali pa jih pridobijo iz okolja (André in sod., 1991; Hohmann, 1997; Nevoigt in Stahl, 1997).

Kvasovke kot kompatibilni topljenec sintetizirajo predvsem glicerol (Martínez de Marañón in sod., 2001; Bely in sod., 2003). Ključni korak pri njegovi sintezi katalizira encim glicerol-3-fosfat dehidrogenaza, ki pretvori dihidroksiaceton fosfat v glicerol-3-fosfat. Pri tem nastaja NAD^+ . Glicerol-3-fosfat se nato defosforilira s specifično glicerol-3-fosfatazo v glicerol. V anaerobnih razmerah poleg osmoregulacije sinteza glicerola vzdržuje tudi redoks ravnotežje v citosolu preko reoksidacije $\text{NADH} + \text{H}^+$ nazaj v NAD^+ (André in sod., 1991; Hohmann, 1997).

2.4.3.2 Etanol

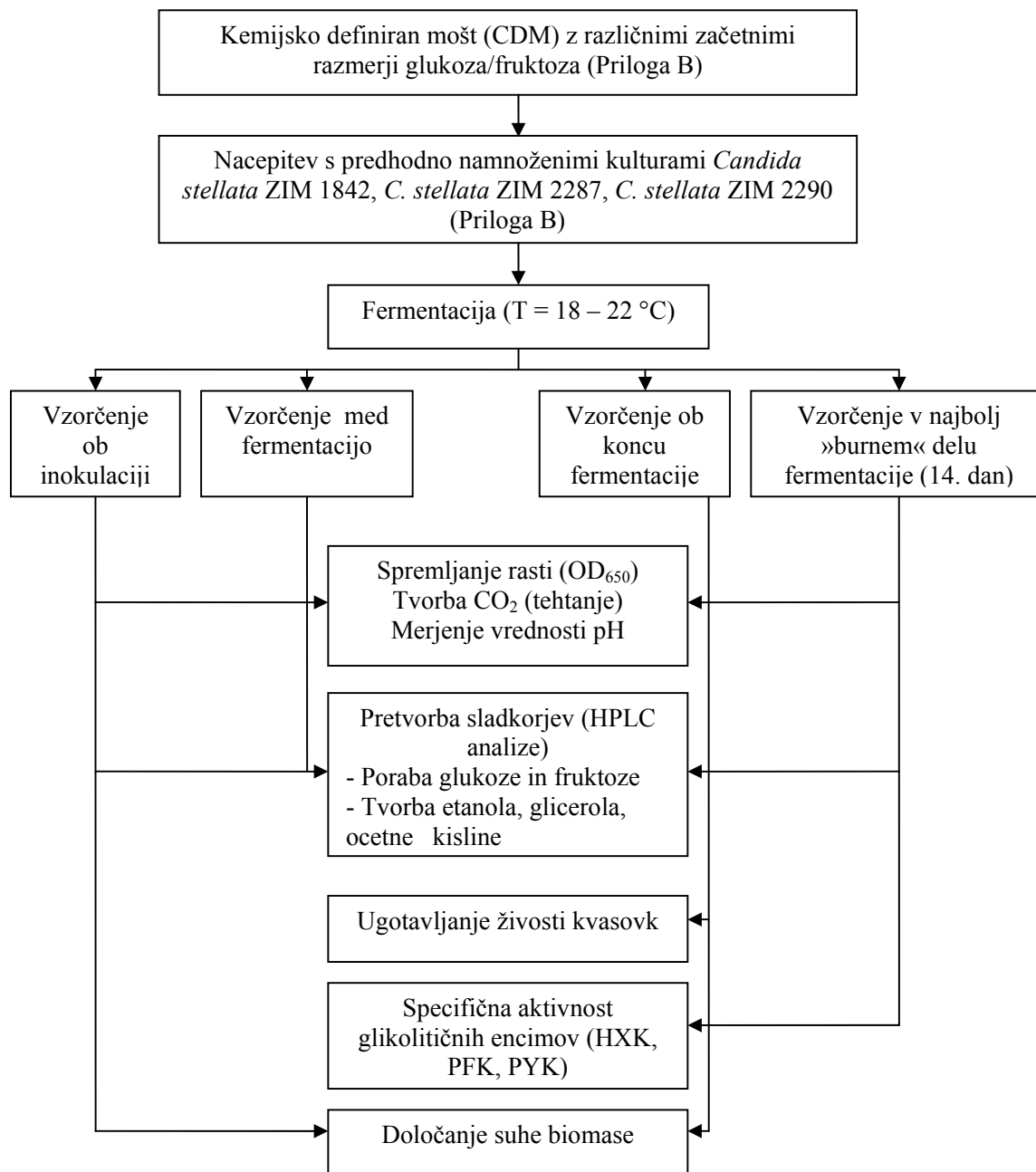
Akumulacija etanola tekom fermentacije mošta predstavlja za mikroorganizme kemijski stres (Pina in sod., 2004), ki zmanjša specifično hitrost rasti kvasovk, živost celic in specifično hitrost fermentacije (D'Amore in Stewart, 1987; Reed in Nagodawithana, 1988). Inhibitorni učinek se začne že, ko je koncentracija etanola v gojišču 2 % (Dittrich, 1995), pomembneje pa začne inhibirati rast kvasovk šele, ko le-te vstopijo iz pozne eksponentne faze v začetno stacionarno fazo rasti. Hitrost fermentacije se takrat začne približevati svoji maksimalni vrednosti. Glikoliza je zelo hitra. Proizvajajo se večje količine etanola in CO₂. Ko se koncentracija etanola v moštu dovolj poveča, celice najprej prenehajo rasti, nato pa se počasi ustavijo še ostali procesi. Fermentacija se začne počasi zaustavljati zaradi pomankanja hranil, predvsem dušika, zaradi akumulacije AMP, inaktivacije transporterjev glukoze in inhibicije HXK (Kunkee in Bisson, 1993). Etanol in HXK se namreč lahko povežeta v neaktivni kompleks (Reed in Nagodawithana, 1988).

Primarni tarči inhibitornega delovanja etanola sta celična membrana in s tem povezan transport snovi v celico (Bisson, 1999; Querol in sod., 2003; Dequin in sod., 2003). Etanol poškoduje membranske proteine ter encime in proteine v celicah (Berthel in sod., 2004). Posledica njegovega delovanja je povečana permeabilnost celične membrane, zaradi katere lahko pride do dramatične izgube magnezijevih in kalcijevih ionov iz celic in do povečane pasivne difuzije protonov v celice, kar stimulira aktivnost membranske H⁺-ATPaze (Kunkee in Bisson, 1993). Upočasniti tudi asimilacijo dušikovih spojin iz mošta (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Med fermentacijo mošta je potrebno pri premagovanju etanolnega stresa kvasovkam zagotoviti dovolj hranil, da se lažje prilagajajo na nove rastne pogoje (D'Amore in Stewart, 1987). Pomembno vlogo pri toleranci kvasovk na etanol ima sposobnost prilagoditve lipidne sestave celične membrane (Pina in sod., 2004). Povečanje količine sterolov z nenasičenimi stranskimi verigami in količine dolgoveržnih nenasičenih maščobnih kislin v membrani poveča odpornost na etanol (D'Amore in Stewart, 1987; Kunkee in Bisson, 1993; Bisson, 1999). Povišana vsebnost ergosterola v membrani stabilizira membranske lipide in proteine (Swan in Watson, 1998). Odpornost kvasovk na etanol naj bi bila odvisna tudi od transporta sintetiziranega alkohola iz celic (Reed in Nagodawithana, 1988). Dokazano je, da so kvasovke občutljivejše na etanol, ki ga same proizvajajo, kot na etanol, ki ga umetno dodajajo v gojišče. Koncentracija etanola v celicah in okolici je približno enaka tekom celotne fermentacije, razen na začetku, ko je koncentracija etanola višja v celicah (Kunkee in Bisson, 1993). Povišana temperatura in visok osmotski tlak, ki je posledica visoke koncentracije sladkorjev v moštu, lahko upočasnita izločanje etanola iz celic (D'Amore in Stewart, 1987).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 2: Hodogram alkoholne fermentacije CDM z različnimi začetnimi razmerji glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata*.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizem

Za izvedbo diplomske naloge smo uporabili tri seve kvasovke vrste *Candida stellata* iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM). Z mutagenozo z etil metan sulfonatom (EMS) in s selekcijo so iz starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 pridobili seva *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290. ZIM je last Laboratorija za industrijske kulture na Katedri za biotehnologijo, Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Po revitalizaciji smo kvasovke hranili v inkubatorju pri 28 °C na agarah ploščah z gojiščem kvasni ekstrakt-sladni ekstrakt (Yeast extract-Malt extract; YM). Živost kvasovk smo ohranjali s precepljanjem kulture vsakih 7 dni na sveže agarne plošče z gojiščem YM.

3.2.2 Mikrobiološka gojišča

3.2.2.1 Kemijsko definiran mošt (CDM) (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992)

Sestava kemijsko definiranega mošta je podana v Prilogi A. Predhodno smo pripravili založne raztopine mineralov, vitaminov in aminokislin (Priloge A1, A2 in A3). Založne raztopine mineralov smo sterilizirali 20 minut v avtoklavu pri 121 °C in pri 1,2 bara. Založni raztopini vitaminov in aminokislin smo sterilizirali s filtracijo preko filtra s porami premera 0,45 µm. Hranili smo jih v hladilniku. Kombinacije gojišč CDM z različnim razmerjem glukoze in fruktoze, ki smo jih pripravili v treh ponovitvah (trije fermentorji s po 1 l gojišča z začetno koncentracijo glukoza/fruktoza 400/0 g/l, trije fermentorji s po 1 l gojišča z začetno koncentracijo glukoza/fruktoza 0/400 g/l, devet fermentorjev s po 1 l gojišča z začetno koncentracijo glukoza/fruktoza 200/200 g/l), in sevov kvasovke *C. stellata* ZIM 1842, *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 so podane v Prilogi B. Gojišča smo po raztapljanju sladkorjev sterilizirali v avtoklavu (20 minut, 121 °C, 1,2 bara).

3.2.2.2 Trdno gojišče YM (Kurtzman in Fell, 1998; Kurtzman in sod., 2003)

Gojišče YM smo uporabljali za ohranjanje živosti kvasovk s precepljanjem in za določanje števila kolonijskih enot iz bioprocenjske brozge.

Gojišče YM (g/l destilirane vode):

sladni ekstrakt	3 g	(Biolife)
kvasni ekstrakt	3 g	(Biolife)
glukoza	10 g	(Kemika)
pepton	5 g	(Oxoid)
agar	20 g	(Biolife)

Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bara ter ga aseptično razlili v sterilne petrijevke.

3.2.3 Raztopine

3.2.3.1 Fiziološka raztopina

Uporabili smo jo za razredčevanje po Kochu.

Priprava založne fiziološke raztopine:

KH ₂ PO ₄	3,4 g	(p.a.; Merck)
NaOH	1 ali 3 M	(p.a.; Merck)

3,4 g KH₂PO₄ smo raztopili v 50 ml destilirane vode in jo nevtralizirali z 1 ali 3 M NaOH do vrednosti pH 7,2. Raztopino v merilni bučki smo z destilirano vodo dopolnili do oznake 100 ml. Koncentrat za fiziološko raztopino smo hranili v hladilniku in ga pred uporabo redčili v razmerju 1,25 ml založne fiziološke raztopine : 1000 ml destilirane vode. Fiziološko raztopino smo nato porazdelili po epruveh (9 ml v eno) in sterilizirali v avtoklavu (20 min; 121 °C; 1,2 bara).

3.2.4 Reagenti

Pri našem delu smo poleg reagentov za gojišča uporabljali še druge. Raztopine smo pripravili z raztapljanjem v destilirani vodi.

- ADP (95 – 99 %; Sigma)
- ATP (min. 99 %; Sigma)
- BSA (100 %; Sigma)
- Bradfordov reagent (BioRad)
- CompleteTM Mini inhibitor proteaz (Roche)
- etanol (p.a.; Merck)
- fosfoenolpiruvat (min. 98 %; Sigma)
- fruktoza (Merck)
- fruktoza-1, 6-bifosfat (99 %; Calbiochem)
- fruktoza-1, 6-bifosfat aldolaza (Sigma)
- fruktoza-6-fosfat (Sigma)
- glicerol (Kemika)
- glicerol-3-fosfat-dehidrogenaza (Sigma)
- glukoza (p.a.; Kemika)
- glukoza-6-fosfat (100 %; Sigma)

- HCl (32 %; Merck)
- Imidazol-HCl pufer (p.a.; Merck)
- KCl (p.a.; Kemika)
- KH₂PO₄ (p.a.; Merck)
- K₂HPO₄ (p.a.; Merck)
- kakodilna kislina-NaOH pufer (min. 98 %; Sigma)
- laktat-dehidrogenaza (Sigma)
- MgCl₂ (p.a.; Kemika)
- mobilna faza za HPLC: H₂SO₄ (p.a.; min. 96,0 %; Carlo Erba)
- NaCl (p.a.; Merck)
- NADH (min. 98 %; Sigma)
- NADP⁺ (min. 98 %; Sigma)
- NaOH (p.a.; Merck)
- (NH₄)₂SO₄ (p.a.; Merck)
- očetna kislina (p.a.; Merck)
- pufri za umerjanje pH-metra: pH 4,01; 7,00 in 9,21 (Mettler Toledo)
- steklene kroglice s premerom 0,5 mm (Sigma)
- triozafosfat-izomeraza (Sigma)

3.2.5 Oprema in aparature

Pri delu smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo in pribor. Poleg tega smo uporabljali še naslednjo opremo:

- avtoklav (Sutjeska)
- avtomatski vzorčevalnik (MIDAS 830; Spark)
- brezprašni komori (Iskra PIO SMBC 122)
- centrifuge (Tehtnica Železniki LC – 321; Sigma 3K30; Eppendorf)
- filtrirna naprava (Sartorius in nitrocelulozni filtri Sartorius; velikost por 0,45 μm)
- fotometer (Photometer MA 9510; Iskra)
- hladilnik (BSK International SK 405)
- inkubator (Sutjeska)
- kolona Aminex HPX – 87H (360 mm × 7,8 mm; BioRad)
- magnetna mešala (Tehtnica Železniki)
- mikroskop (Leica ATC 2000)
- pH-meter (Mettler Toledo)
- števna komora Bürker-Türk (Brand)
- programska oprema za nadzor spektrofotometra Pharmacia: Swift-Reaction Kinetics 1.01
- rotacijska stresalnika (Tehtnica VIBROMIX 403 in Tehtnica Železniki VRVI – 403)
- sistem za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Knauer)

- spektrofotometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000)
- sušilna omara (Elektromedicina)
- sušilnik (Sutjeska)
- tehtnice (Sartorius-excellence; Sartorius-analytic)
- vodna kopel (HETO)
- vrtinčnika (Tehtnica Železniki VIBROMIX 104 EV)
- zamrzovalna omara (HETO Ultra Freeze; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)

3.3 METODE

3.3.1 Gojitvene metode

3.3.1.1 Metoda namnožitve biomase za vcepke

Tekoče vcepke za fermentacijo smo pripravili v dveh 1000 ml in dveh 500 ml erlenmajericah s stransko kivetom, ki so vsebovale 250 ml oziroma 200 ml gojišča CDM z vsebnostjo sladkorjev 20 g/l (10 g/l glukoze in 10 g/l fruktoze). S cepilno zanko smo v sterilno gojišče z agarnih plošč YM prenesli toliko dva dni starih kultur *C. stellata* ZIM 1842, *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290, da smo dosegli optično gostoto približno 0,20 pri valovni dolžini 650 nm (OD_{650}). Kvasovke smo namnoževali na rotacijskem stresalniku z 200 vrt./min pri temperaturi $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ do stacionarne faze rasti. Ta je nastopila, ko je brozga v erlenmajericah dosegla vrednost OD_{650} med 1,8 in 1,9. Tako smo dosegli dovolj visoko koncentracijo celic za nadaljnji potek dela. Namnožene kvasovke smo s fiziološko raztopino razredčili po Kochu in s pomočjo Bürker-Türkovega hemocitometra določili število kvasovk v 1 ml CDM. Z metodo razmazovanja na plošče smo določili število kolonijskih enot (KE ali ang. CFU) v 1 ml CDM. Potreben volumen vcepka smo preračunali tako, da je bila v 1000 ml mošta skupna začetna koncentracija kvasovk približno $1 \cdot 10^5$ CFU/ml (Povhe Jemec, 2003). Vcepke smo porazdelili po fermentorjih z volumnom 1,5 l in z delovnim volumnom 1 l, ki so že vsebovali sterilna gojišča CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza (Priloga B).

3.3.1.2 Anaerobni šaržni bioproces (alkoholna fermentacija)

Fermentacija v petnajstih fermentorjih z delovnim volumnom 1 l je potekala 43 dni pri temperaturi med 18 in $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Začetna koncentracija sladkorjev v CDM je bila približno 400 g/l. Fermentorji so se razlikovali glede na začetno razmerje glukoza/fruktoza ter po sevu kvasovke, s katerim smo nacepili gojišče. Na fermentorje smo pred nacepljanjem namestili vrelnne vehe za odvajanje CO_2 , ki je nastajal med fermentacijo. Vzorčili smo na 3 ali 4 dni. Iz posameznega fermentorja smo vzeli po 3 ml vzorca, kateremu smo izmerili vrednost pH, OD_{650} ter ga centrifugirali. Supernatante smo zamrznili in jih kasneje analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Fermentorje smo stehali pred in po vzorčenju, kar nam je omogočilo izračun količine CO_2 , ki je izhajal med fermentacijo.

3.3.2 Analitične metode

3.3.2.1 Merjenje prirasta biomase z merjenjem optične gostote brozge (Batič in Bayer, 1996; Madigan in sod., 2003)

Rast kvasovk pri namnoževanju vcepka na stresalniku v erlenmajericah s stransko kiveto smo spremljali z merjenjem intenzitete prepuščene svetlobe v fotometru pri valovni dolžini 650 nm, kar smo izrazili kot optično gostoto (OD_{650}). Podobno smo spremljali tudi rast kvasovk med fermentacijo, ko smo OD_{650} izmerili v odvzetih vzorcih.

3.3.2.2 Merjenje vrednosti pH

Vrednost pH smo merili v vzorcih, vzetih iz posameznih fermentorjev. Za merjenje smo uporabili pH-meter Mettler Toledo, ki smo ga umerili v treh točkah s pufrni standardnih vrednosti pH 4,01; 7,00 in 9,21.

3.3.2.3 Spremljanje tvorbe ogljikovega dioksida (CO_2) (Bely in sod., 2003)

Med fermentacijo smo spremljali sproščanje CO_2 . Količino sproščenega CO_2 smo določili posredno s tehtanjem fermentorjev pred in po posameznem vzorčenju. Izračunali smo izgubo mase fermentorjev pred posameznim odvzgom vzorca.

3.3.2.4 Določanje koncentracije glukoze, fruktoze in zunajceličnih metabolitov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) v bioproceni brozgi

Koncentracijo glukoze, fruktoze, etanola, glicerola in očetne kisline smo določili s HPLC (Luparia in sod., 2004). Uporabili smo termostatorirano kolono Aminex HPX – 87H (360 mm × 7,8 mm; BioRad), ki je bila sprana s 5 mM raztopino H_2SO_4 . Na koloni so se metaboliti ločevali na osnovi ionske izmenjave, velikosti in naboja molekul. Z detektorjem RI (detektor na osnovi lomnih količnikov raztopin) smo določili glukozo, fruktozo, etanol in glicerol. Očetno kislino smo določili z detektorjem UV/VIS. Za umerjanje analitskega postopka smo uporabili metodo zunanjih standardov (površina pika določenega standarda je bila mera za koncentracijo snovi). Standardne raztopine smo pripravili tako, da smo raztopili glukozo, fruktozo, etanol, glicerol in očetno kislino v destilirani vodi, in sicer v takem koncentracijskem območju kot v CDM. Pri kvalitativnem določanju smo uporabili vodno raztopino posameznega standarda in tako določili zadrževalne čase na koloni. Zadrževalni časi na koloni Aminex za posamezne spojine so podani v Prilogi D. Rezultate smo izrazili v g/l bioprocene brozge.

3.3.2.5 Določanje skupnega števila kvasovk in njihove živosti

Na Bürker-Türk-ov hemocitometer smo dali kapljico suspenzije kvasovk, ki smo jo razredčili v fiziološki raztopini, in pod mikroskopom prešteli število celic, ki smo jih izrazili kot število vseh celic/ml.

Izračun skupnega števila kvasovk:

$$\text{št. vseh celic / ml} = X \cdot R \cdot f \quad \dots (3)$$

X – število prešteti celic v kvadratu; R – redčitveni faktor brozge; f – faktor za števno ploščico, ki je odvisen od območja štetja ($f = 2,5 \cdot 10^5$)

Vzorci smo v fiziološki raztopini razredčili po Kochu in 0,1 ml ustrezno razredčenega vzorca v treh paralelkah s sterilnimi steklenimi kroglicami enakomerno porazdelili po površini agarnih plošč z gojiščem YM. Iz vsake žive celice, ki je bila zmožna reprodukcije, je zrastle kolonija. Po končani inkubaciji pri 28 °C smo prešteli število kolonij na ploščah. Rezultat smo podali kot število kolonijskih enot/ml (KE/ml) oziroma kot število CFU/ml (Madigan in sod., 2003).

Izračun števila kolonijskih enot:

$$\text{št. KE / ml} = \frac{Y \cdot R}{V} \quad \dots (4)$$

Y – število kolonijskih enot, prešteti na ploščah; R – redčitveni faktor brozge; V – volumen, ki smo ga razmazali na plošče

3.3.2.6 Določanje koncentracije suhe biomase (Paš in sod., 2004)

Po 8 ml brozge iz vsakega fermentorja smo odpipetirali v posušene in stehtane centrifugirke ter centrifugirali 5 minut pri 4000 vrt./min. Usedlino oziroma sedimentirano biomaso smo dvakrat sprali z 0,015 M KH_2PO_4 (fosfatnim) pufrom z vrednostjo pH 4,0. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant, usedlo biomaso pa smo sušili pri temperaturi 105 °C do konstantne mase. Centrifugirke s posušeno biomaso smo spet stehtali in od njihove mase odšteli maso praznih centrifugirk. Tako smo dobili suho biomaso. Rezultat smo izrazili v gramih suhe biomase na liter brozge.

3.3.2.7 Priprava celičnega ekstrakta (Jamnik in Raspor, 2003)

Za pripravo celičnih ekstraktov smo uporabili metodo razbijanja celic s steklenimi kroglicami. Odcentrifugirali smo toliko bioprocesne brozge, da smo pridobili čim več (do 1 g) mokre

biomase. To smo nato dvakrat sprali z 20 ml 0,015 mM fosfatnega pufera KH_2PO_4 z vrednostjo pH 4,0. Vzorcem biomase smo dodali 5 ml 50 mM fosfatnega pufera z vrednostjo pH 7,0 in dodanim inhibitorjem proteaz (Roche) in 5 g sterilnih steklenih kroglic s premerom 0,5 mm (razmerje biomasa : pufer : kroglice = 1 : 5 : 5) ter jih postavili na led. Celice v vzorcu smo razbili na vibracijskem mešalniku, kjer smo jih mešali štirikrat po 1 minuto z vmesnim hlajenjem na ledu. Nepoškodovane celice in steklene kroglice smo odstranili s centrifugiranjem na $20000 \times g$ 20 min pri 4 °C. Supernatant smo uporabili kot celični ekstrakt. Shranili smo ga v mikrocentrifugirkah pri -80 °C.

50 mM fosfatni pufer z vrednostjo pH 7,0 smo pripravili tako, da smo 50 mM pufru K_2HPO_4 dodajali 50 mM pufer KH_2PO_4 do vrednosti pH 7,0.

3.3.2.8 Določanje količine topnih proteinov v celičnem ekstraktu (Bradford, 1976)

V vzorcih celičnih ekstraktov smo določili količino topnih proteinov po Bradfordu. Metoda temelji na vezavi barvila Comassie brilliant modro G-250 na proteine. Pri tem se barva spremeni iz rdeče v modro, s tem pa se premakne tudi absorpcijski maksimum barvila, in sicer s 465 nm na 595 nm. Vezava barvila je zelo hitra. Kompleks protein – barvilo pa je obstojen do 1 h.

Zamrznjen (-80 °C) celični ekstrakt smo odtajali v vodni kopeli s temperaturo 25 °C. V centrifugirke smo odpipetirali po 50 μl celičnega ekstrakta, mu dodali 2,5 ml razredčenega Bradfordovega reagenta (5 \times razredčen Bradfordov koncentrat), premešali in po 5 minutah izmerili absorbanco pri 595 nm. Pri slepem vzorcu smo namesto celičnega ekstrakta dodali 50 μl 0,15 M raztopine NaCl. Iz umeritvenih krivulj smo izračunali količino topnih proteinov v 50 μl celičnega ekstrakta:

- po 14. dneh fermentacije (Priloga C1):

$$A_{595} = 0,0189 \cdot \text{masa proteinov} + 0,0287 \quad \dots (5)$$

- po 43. dneh fermentacije (Priloga C2):

$$A_{595} = 0,0189 \cdot \text{masa proteinov} + 0,0480 \quad \dots (6)$$

Rezultat smo izrazili kot mg topnih proteinov na ml celičnega ekstrakta. Za izdelavo umeritvenih krivulj smo uporabili znane koncentracije govejega serumskega albumina (ang. Bovine Serum Albumin; BSA).

3.3.2.9 Določanje aktivnosti glikolitičnih encimov v celičnem ekstraktu

Aktivnost encimov smo izračunali iz naklona absorpcijske premice in rezultate podali v encimskih enotah (U). Encimska enota (ang. Unit; U) je definirana kot količina encima, ki oksidira (reducira) 1 μmol substrata v 1 minuti (Bavec in sod., 2000).

Aktivnost encimov v celičnih ekstraktih smo merili tri minute v 30-sekundnih časovnih intervalih s spektrofotometrom (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000) s pomočjo programa za nadzor spektrofotometra (Swift – Reaction Kinetics) pri temperaturi 25 °C in valovni dolžini 340 nm. Ekstinkcijski koeficient ($\epsilon_{340\text{nm}}$) reduciranih piridinskih dinukleotidnih koencimov NAD(P)H + H⁺ znaša $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (de Jong-Gubbels in sod., 1995). Program je aktivnost encimov izračunal na podlagi Beer-Lambert-ovega zakona:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l \quad \dots (7)$$

A – absorbanca; I_0 in I – intenziteta vstopne in izstopne svetlobe; c – koncentracija vzorca oziroma substrata (M); l – dolžina poti žarka skozi vzorec v centimetrih (1 cm); ϵ – molarni ekstinkcijski koeficient ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bavec in sod., 2000)

Pri merjenju encimske aktivnosti smo merili spremembo koncentracije vzorca substrata v času, in sicer tako, da smo merili spremembo absorbance v času:

$$\frac{\Delta c}{\text{min}} = \frac{\Delta A / \text{min}}{\epsilon \cdot l} \quad \dots (8)$$

Primer izračuna aktivnosti encima v encimskih enotah (U), če je substrat NAD(P)H:

$$U = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = \frac{\Delta A / \text{min}}{6,22 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot V \quad \dots (9)$$

V – volumen reakcijske mešanice (1 ml)

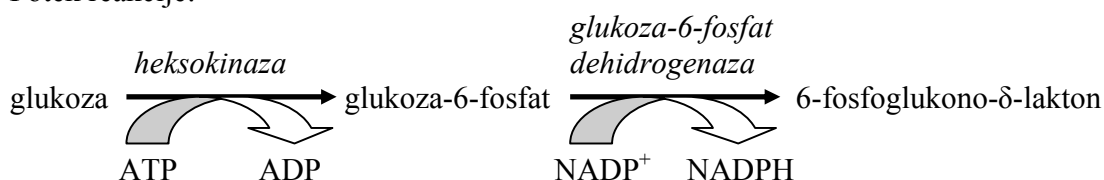
Pri meritvah smo v reakcijskih mešanicah uporabili tolikšen volumen celičnega ekstrakta, da je vseboval 150 ali 100 ali 50 μg topnih proteinov, odvisno od količine celičnega ekstrakta, ki smo ga lahko pripravili glede na količino pridobljene biomase. Specifične aktivnosti encimov smo izrazili v U/mg topnih proteinov. Predhodno zamrznjene (–80 °C) celične ekstrakte smo odtajali v vodni kopeli s temperaturo 25 °C. Tudi vse pufre in reagente, ki smo jih uporabili pri reakcijah, smo ogreli na 25 °C. Kot slep vzorec za posamezni encim smo uporabili vse reagente v reakcijski mešanici razen celičnega ekstrakta, ki smo ga nadomestili z enako količino 0,15 M NaCl.

- Določanje aktivnosti encima heksokinaze (HXK):

Aktivnost encima heksokinaze (EC 2.7.1.1, ATP/D-heksoza-6-fosfotransferaza) smo določili z modificirano metodo po Espinelu in sod. (1996). Uporabili smo naslednje pufre in reagente: 50 mM imidazolni puffer (pH 7,6), 250 mM MgCl₂, 250 mM glukozo, 40 mM NADP⁺, 0,1 U/μl glukoza-6-fosfat dehidrogenazo, 50 mM ATP.

Reakcijska mešanica (1 ml) je vsebovala: 785 – X μl 50 mM imidazolnega pufra (pH 7,6), 40 μl 250 mM MgCl₂, 100 μl 250 mM glukoze, 25 μl 40 mM NADP⁺, 10 μl 0,1 U/μl glukoza-6-fosfat dehidrogenaze in X μl celičnega ekstrakta s vsebnostjo topnih proteinov 150 ali 100 ali 50 μg. Za začetek encimske reakcije smo dodali 40 μl 50 mM ATP.

Potek reakcije:

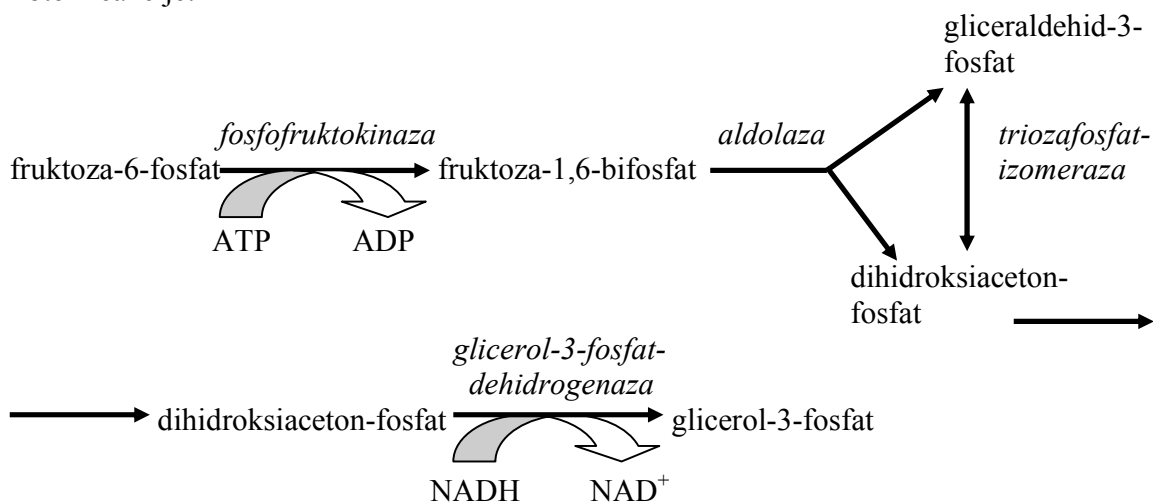


- Določanje aktivnosti encima fosfofruktokinaze (PFK):

Aktivnost encima fosfofruktokinaze (EC 2.7.1.11, ATP/D-fruktozo-6-fosfat-1-fosfotransferaza) smo določili po metodi de Jong – Gubbels in sod. (1995). Uporabili smo naslednje pufre in reagente: 50 mM imidazolni-HCl puffer (pH 7,0), 64 mM (NH₄)₂SO₄, 250 mM MgCl₂, 15 mM NADH, 50 mM ATP, 0,1 U/μl fruktoza-1, 6-bifosfat aldolazo, 0,1 U/μl glicerol-3-fosfat dehidrogenazo, 0,1 U/μl triozafosfat izomerazo, 25 mM fruktoza-6-fosfat.

Reakcijska mešanica (1 ml) je vsebovala: 821 – X μl 50 mM imidazolnega-HCl pufra (pH 7,0), 100 μl 64 mM (NH₄)₂SO₄, 20 μl 250 mM MgCl₂, 10 μl 15 mM NADH, 10 μl 50mM ATP, 5 μl 0,1 U/μl fruktoza-1, 6-bifosfat aldolaze, 6 μl 0,1 U/μl glicerol-3-fosfat dehidrogenaze, 18 μl 0,1 U/μl triozafosfat izomeraze, X μl celičnega ekstrakta s vsebnostjo topnih proteinov 150 ali 100 ali 50 μg. Za začetek encimske reakcije smo dodali 10 μl 25 mM fruktoza-6-fosfata.

Potek reakcije:

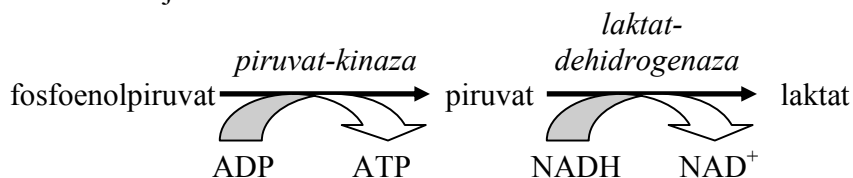


- Določanje aktivnosti encima piruvat kinaze (PYK):

Aktivnost encima piruvat kinaza (EC 2.7.1.40, ATP/piruvat-2-O-fosfotransferaza) smo določili po metodi van Hoek in sod. (2000). Uporabili smo naslednje pufre in reagente: 100 mM kakodilno kisline-NaOH puffer (pH 6,2), 1 M KCl, 100 mM ADP, 10 mM fruktoza-1, 6-bifosfat, 250 mM MgCl₂, 15 mM NADH, 1 U/μl laktat dehidrogenazo, 100 mM fosfoenolpiruvat.

Reakcijska mešanica (1 ml) je vsebovala: 558,75 – X μl 100 mM kakodilne kisline-NaOH pufra (pH 6,2), 100 μl 1 M KCl, 100 μl 100 mM ADP, 100 μl 10 mM fruktoza-1, 6-bifosfata, 100 μl 250 mM MgCl₂, 10 μl 15 mM NADH, 11,25 μl 1 U/μl laktat dehidrogenaze, X μl celičnega ekstrakta s vsebnostjo topnih proteinov 150 μg. Za začetek encimske reakcije smo dodali 20 μl 100 mM fosfoenolpiruvata.

Potek reakcije:



3.3.3 Metode za obdelavo podatkov

Poskuse smo izvedli v več neodvisnih ponovitvah. Dobljene rezultate smo statistično ovrednotili. Izračunali smo tudi določene parametre rasti, ki so nam bili v pomoč pri razlagi vpliva koncentracije glukoze in fruktoze na alkoholno fermentacijo.

3.3.3.1 Statistična obdelava podatkov

Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost treh ponovitev. Podali smo tudi oceno variabilnosti kot standardni odklon od povprečne vrednosti. Vse statistične operacije smo izvedli s pomočjo programa Microsoft Excel (average, stdev).

- Povprečna vrednost

Alkoholno fermentacijo v gojiščih z različnimi razmerji glukoza/fruktoza in različnimi sevi kvasovke *C. stellata* smo izvedli v treh ponovitvah. Rezultate meritev (poraba glukoze in fruktoze, tvorba etanola, glicerola in očetne kisline, tvorba CO₂, spreminjanje vrednosti pH, določanje suhe biomase in števila celic, aktivnost glikolitičnih encimov) smo podali kot aritmetično sredino (Adamič, 1989; Košmelj, 2001).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots (10)$$

\bar{X} – povprečna vrednost; n – število vzorcev; X_i – vrednost i – te meritve; n – število meritev

- Standardni odklon in koeficient variabilnosti

Za oceno variabilnosti rezultatov pri paralelnih vzorcih smo uporabili standardni odklon (SD) in koeficient variabilnosti (KV) (Adamič, 1989; Košmelj 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad \dots (11)$$

$$KV (\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100 \quad \dots (12)$$

3.3.3.2 Določitev rastnih parametrov (Heijnen, 2006)

- Specifična hitrost porabe substrata (q_s)

$$q_s \text{ (g sladk./g SB/h)} = \frac{S_z - S_k}{X_k - X_z} \div t_{kult}. \quad \dots (13)$$

X_z – koncentracija suhe biomase ob inokulaciji (g/l); X_k – koncentracija suhe biomase v brozgi po času t (g/l); S_z – koncentracija sladkorja ob inokulaciji (g/l); S_k – koncentracija sladkorja v brozgi po času t (g/l); $t_{kult.}$ – čas kultivacije (h)

- Specifična hitrost tvorbe etanola (q_{EtOH})

$$q_{EtOH} \text{ (g EtOH/g SB/h)} = \frac{E_z - E_k}{X_k - X_z} \div t_{kult}. \quad \dots (14)$$

E_z – koncentracija etanola ob inokulaciji (g/l); E_k – koncentracija etanola v brozgi po času t (g/l)

- Specifična hitrost tvorbe glicerola (q_G)

$$q_G \text{ (g glic./g SB/h)} = \frac{G_z - G_k}{X_k - X_z} \div t_{kult}. \quad \dots (15)$$

G_z – koncentracija glicerola ob inokulaciji (g/l); G_k – koncentracija glicerola v brozgi po času t (g/l)

- Specifična hitrost tvorbe očetne kisline (q_o)

$$q_o \text{ (g ocet.k./g SB/h)} = \frac{O_z - O_k}{X_k - X_z} \div t_{kult}. \quad \dots (16)$$

O_z – koncentracija očetne kisline ob inokulaciji (g/l); O_k – koncentracija očetne kisline v brozgi po času t (g/l)

- Specifična hitrost tvorbe CO_2 (q_{CO_2})

$$q_{CO_2} \text{ (g } CO_2\text{/g SB/h)} = \frac{CO_{2z} - CO_{2k}}{X_k - X_z} \div t_{kult}. \quad \dots (17)$$

CO_{2z} – količina sproščenega CO_2 ob inokulaciji (g/l); CO_{2k} – količina sproščenega CO_2 v brozgi po času t (g/l)

- Izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase ($Y_{X/S}$)

$$Y_{X/S} (\text{g SB/ g sladk.}) = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_k - X_z}{S_z - S_k} \quad \dots (18)$$

$Y_{X/S}$ – izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase; X_z – koncentracija suhe biomase ob inokulaciji (g/l); X_k – koncentracija suhe biomase v brozgi po času t (g/l); S_z – koncentracija sladkorja ob inokulaciji (g/l); S_k – koncentracija sladkorja v brozgi po času t (g/l)

- Izkoristek vira ogljika za tvorbo etanola ($Y_{E/S}$)

$$Y_{E/S} (\text{g EtOH/ g sladk.}) = \frac{\Delta E}{\Delta S} = \frac{E_k - E_z}{S_z - S_k} \quad \dots (19)$$

$Y_{E/S}$ – izkoristek vira ogljika za tvorbo etanola; E_z – koncentracija etanola ob inokulaciji (g/l); E_k – koncentracija etanola v brozgi po času t (g/l); S_z – koncentracija sladkorja ob inokulaciji (g/l); S_k – koncentracija sladkorja v brozgi po času t (g/l)

- Maksimalna specifična hitrost rasti (μ_{max})

$$\mu_{max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad \dots (20)$$

μ_{max} – maksimalna specifična hitrost rasti (h^{-1}); X – koncentracija biomase (g/l); t – čas

4 REZULTATI

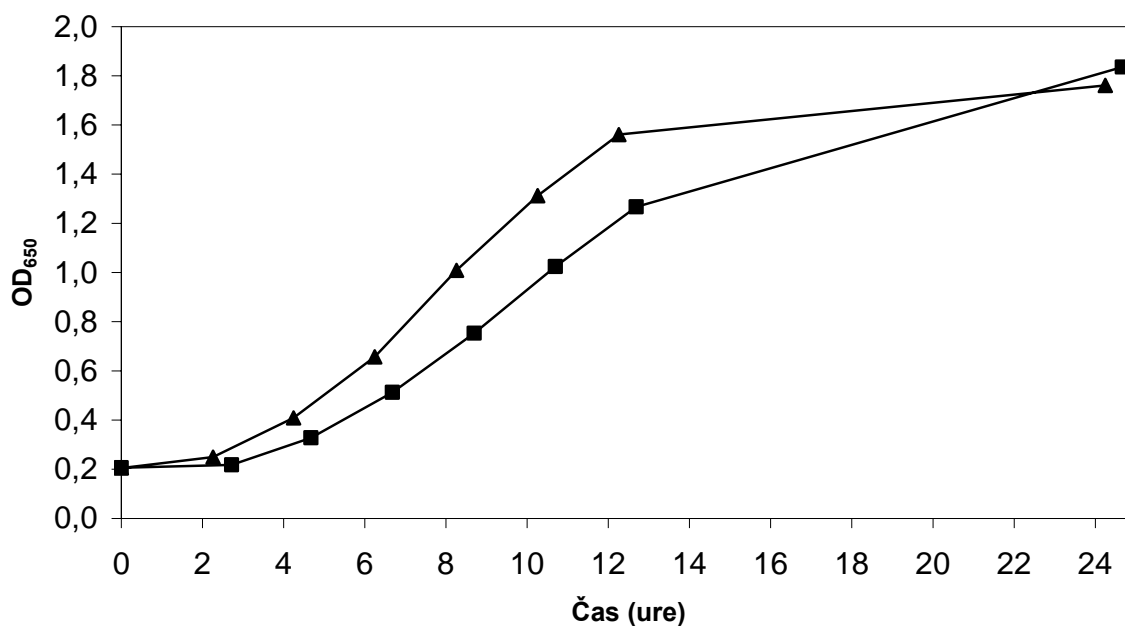
Problematika fermentacije mošta v vino je večinoma preučevana s čisto kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, čeprav realno to pretvorbo opravi več vrst kvasovk, ki so v času fermentacije prisotne v moštu. Namen tega dela je bil ugotoviti vpliv endogene kvasovke *Candida stellata* na učinkovitost pretvorbe glukoze in fruktoze v etanol.

Med alkoholno fermentacijo smo spremljali spreminjanje OD_{650} in pH bioprocene brozge, količino sproščenega CO_2 , porabo glukoze in fruktoze ter tvorbo etanola, glicerola in očetne kisline. Ob koncu fermentacije smo preverili živost kvasne biomase. Aktivnost heksokinaze, fosfofruktokinaze in piruvat kinaze smo preverili po 14. dneh in na koncu fermentacije. Iz fermentorjev smo pridobili zelo majhne količine mokre biomase, zato je lahko predvsem pri merjenju aktivnosti encimov po 14. dneh fermentacije prišlo do napak.

V tem poglavju so predstavljeni rezultati laboratorijskega dela, ki je potekalo od 9. 2. 2006 do 2. 6. 2006 in je obsegalo približno 290 delovnih ur. Poskuse in meritve smo opravili v treh vzporednih neodvisnih ponovitvah. Rezultati so predstavljeni v obliki grafov in preglednic. Podrobnejši rezultati s statističnimi izračuni so navedeni v poglavju Priloge.

4.1 VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA ALKOHOLNO FERMENTACIJO PRI KVASOVKI *Candida stellata* ZIM 1842

4.1.1 Gojenje kvasovke in namnoževanje vcepka



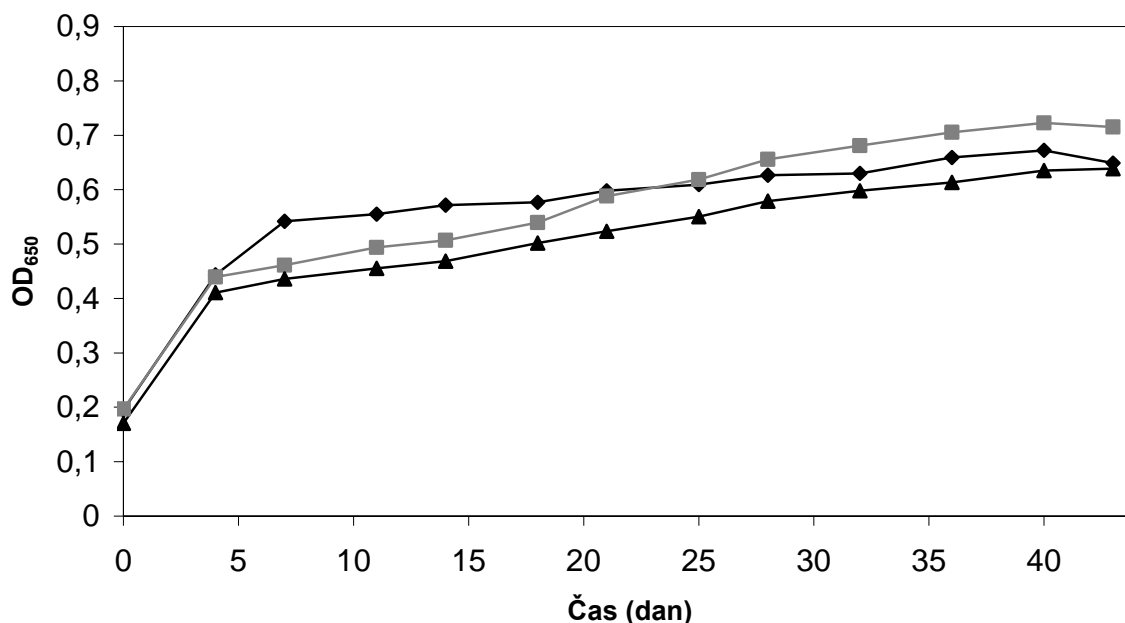
Slika 3: Rastna krivulja kvasovke *C. stellata* ZIM 1842 pri 28 °C med 25 urnim aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku (200 vtr./min) v kemijsko definiranem moštu (CDM) z različnimi koncentracijami sladkorjev: 10 g/l glukoze in 10 g/l fruktoze (-▲-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-■-).

Kvasovko *C. stellata* ZIM 1842 smo namnožili na stresalniku pri 25 °C in 200 vrt./min. Rastna krivulja ima tipično obliko rastne krivulje mikroorganizmov (Slika 3). Iz slike je razvidno, da koncentracija sladkorjev v kemijsko definiranem moštu (CDM) vpliva na hitrost rasti kvasovk. Kvasovke, ki smo jih gojili v CDM z začetno koncentracijo sladkorjev 400 g/l, so imele daljšo fazo prilagajanja. V eksponentno fazo rasti so vstopile kasneje (po približno petih urah gojenja) in tudi faza pojemajoče ter stacionarna faza rasti sta nastopili kasneje (po približno trinajstih urah gojenja). Medtem ko so kvasovke, ki smo jih gojili v CDM z začetno koncentracijo sladkorjev 20 g/l, imele krajšo fazo prilagajanja, v eksponentno fazo rasti so vstopile po približno štirih urah gojenja in v fazo pojemajoče ter stacionarno fazo rasti so vstopile po približno enajstih urah gojenja.

Kvasni vcepek smo namnoževali 24 ur v CDM z začetno koncentracijo sladkorjev 20 g/l do optične gostote 1,8. Tako smo zagotovili zadostno koncentracijo celic za začetek poskusa. Namnožene kvasovke smo s fiziološko raztopino razredčili po Kochu in s pomočjo Bürker-Türkovega hemocitometra določili število kvasovk v 1 ml CDM. Z razmazovanjem na plošče smo določili število kolonijских enot v 1 ml CDM. Potreben volumen vcepka smo preračunali

tako, da je bila v 1000 ml CDM skupna začetna koncentracija kvasovk približno $1 \cdot 10^5$ CFU/ml (Povhe Jemec, 2003).

4.1.2 Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo



Slika 4: Spreminjanje vrednosti OD_{650} med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza zaradi rasti kvasovke *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (♦; —); 400 g/l fruktoze (■; —); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (▲; —). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Med fermentacijo smo spremljali vrednosti OD_{650} v posameznem gojišču CDM, ki so se spreminjale zaradi rasti kvasovke *C. stellata* ZIM 1842 (Slika 4). V prvih dneh fermentacije opazimo porast kvasovk, ki se nadaljuje do približno 30. dne, pri čemer se naklon krivulj sčasoma zmanjša. Pri kvasovkah, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l in fruktoze 400 g/l, začne vrednost OD_{650} po 40. dneh fermentacije celo padati. Najnižjo povprečno vrednost OD_{650} so dosegle kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetnimi koncentracijami glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Najvišjo povprečno vrednost OD_{650} pa so dosegle kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l.

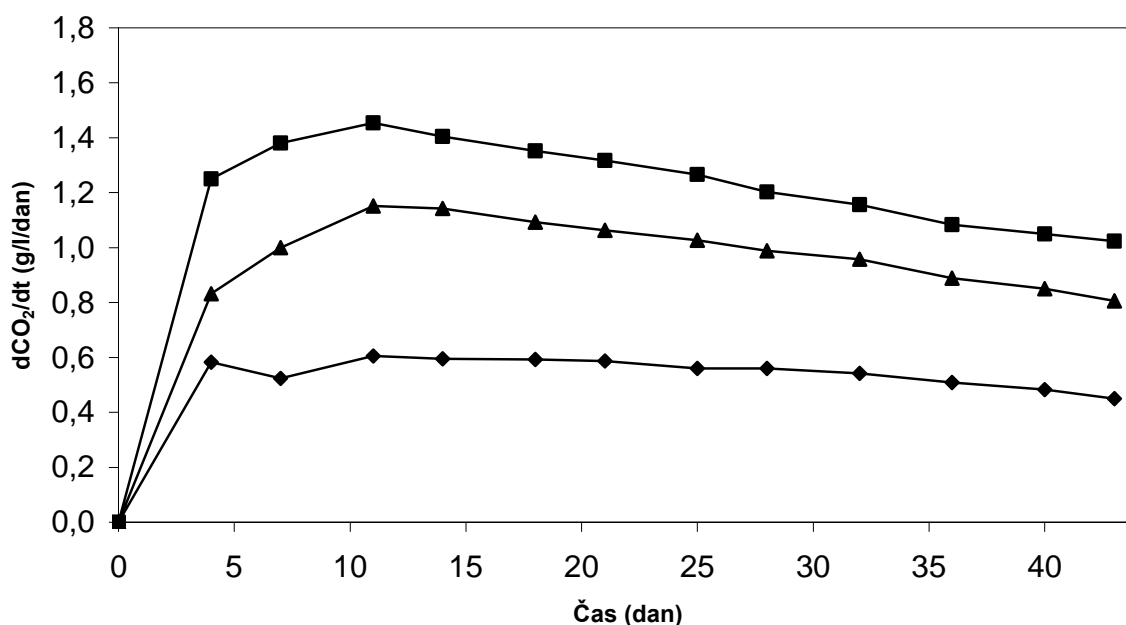
Iz podatkov v preglednici 1 razberemo, da je bilo povprečno število vseh celic v 1 ml gojišča približno enako v vseh fermentorjih. Razlike so bile očitnejše pri povprečnem številu kolonijskih enot v 1 ml gojišča in pri odstotku živosti. Največje število CFU/ml so imele kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l. Imele so tudi največji odstotek živosti (4 %). Sledile so jim kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno

koncentracijo 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze. Njihov odstotek živosti je bil 0,1 %. Število kvasovk, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l in ki so bile sposobne tvoriti kolonije, je bilo manjše od 1000.

Preglednica 1: Število kolonijskih enot v 1 ml gojišča (CFU/ml) in ocena živosti kvasovk *C. stellata* ZIM 1842 po končani 43-dnevni fermentaciji gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Koncentracija glc/fru v CDM (g/l)	Hemocitometer	YM plošče	Živost (%)
	Št. vseh celic*10 ⁷ /ml	Št. CFU/ml	
400/0	3,0	1,1*10 ⁶	4
0/400	3,2	< 1000	< 0,003
200/200	3,2	2,3*10 ⁴	0,1

4.1.3 Sproščanje ogljikovega dioksida (CO₂)



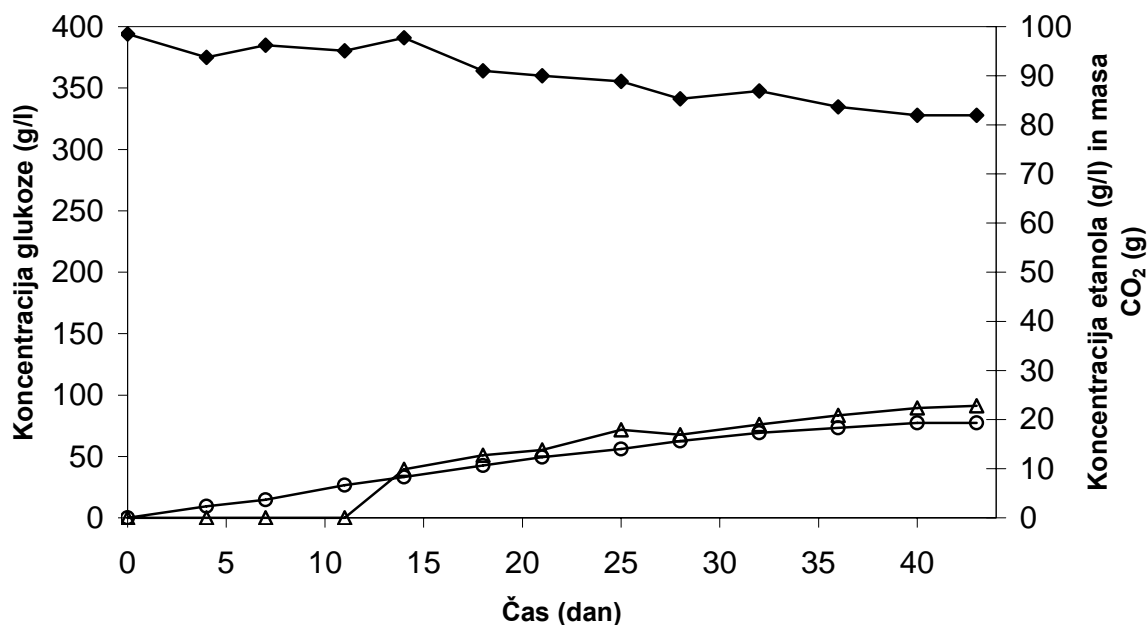
Slika 5: dCO_2/dt med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-◆-); 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Med poskusom smo fermentorje tudi tehtali. S tem smo spremljali sproščanje CO₂ med alkoholno fermentacijo zaradi rasti kvasovke *C. stellata* ZIM 1842 (Slika 5). Vsi fermentorji so imeli podoben vzorec sproščanja CO₂ po času, le-da so bile količine sproščenega CO₂ različne in so bile odvisne od koncentracij glukoze in fruktoze v gojiščih. V približno štirih

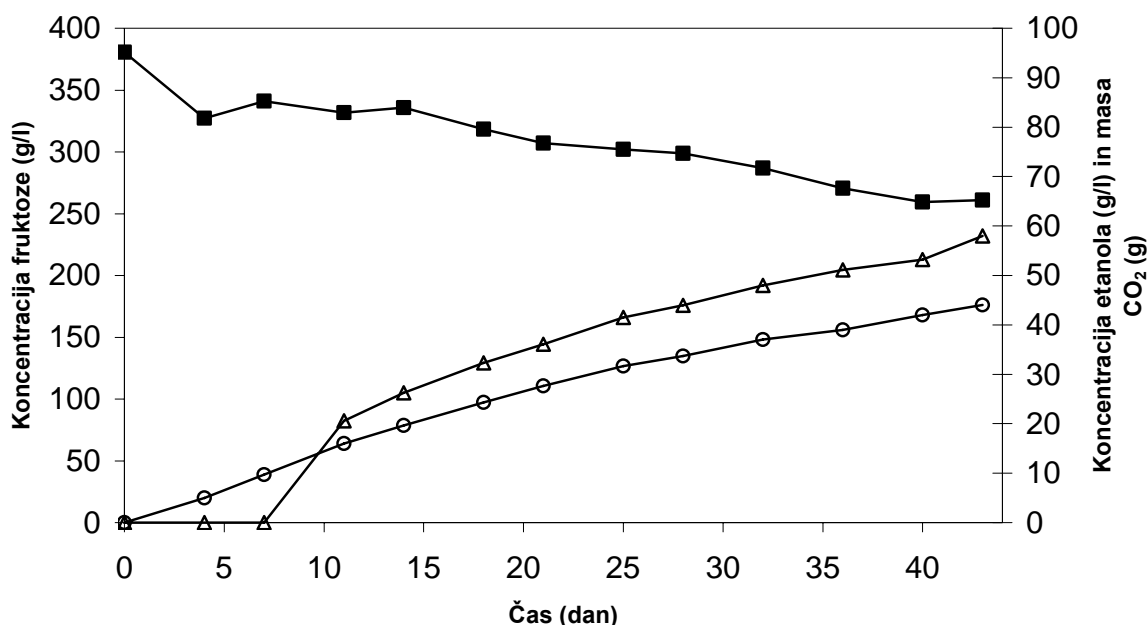
dneh se je pri vseh fermentorjih količina sproščenega CO₂ močno povečala. Naklon krivulje se je nato zmanjšal, vendar je bil še vedno pozitiven do približno 11. dne fermentacije. Nato se je začela hitrost tvorbe CO₂ zmanjševati. Največje količine CO₂ so tvorile kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču CDM z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l. Najmanjše količine CO₂ so tvorile kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču CDM z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l.

4.1.4 Fermentacijski profili

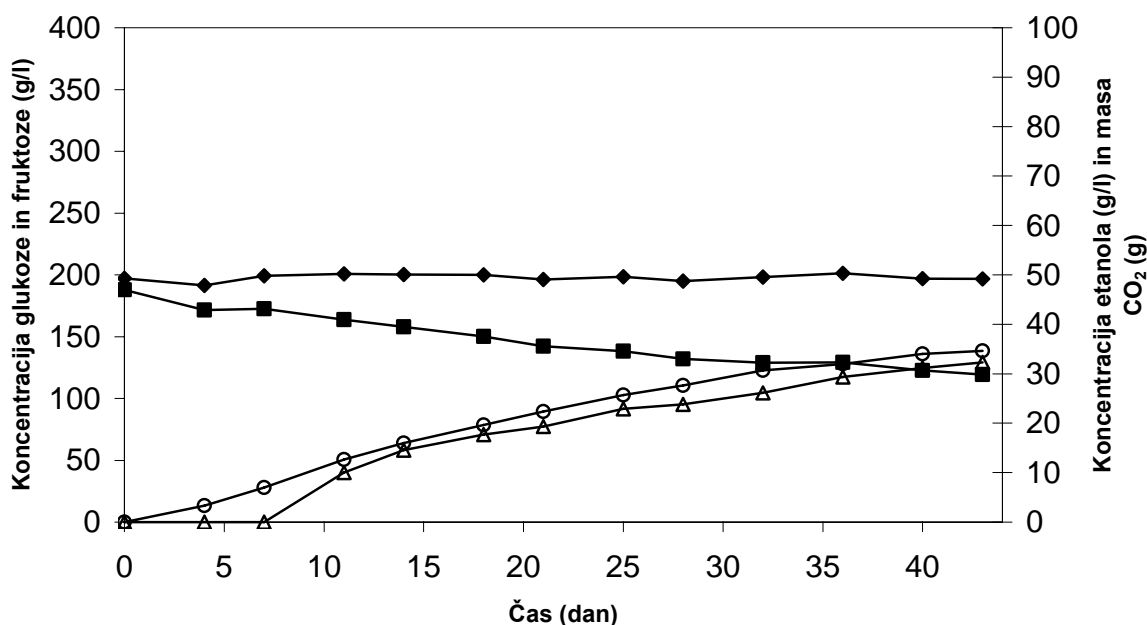
Na slikah 6, 7 in 8 so združene krivulje, ki ponazarjajo porabo glukoze in fruktoze ter tvorbo etanola in CO₂ med alkoholno fermentacijo s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842 v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Če primerjamo porabo glukoze s porabo fruktoze, lahko iz naklonov krivulj sklepamo, da se je glukoza porabljala počasneje kot fruktoza. Če sta bila v gojišču prisotna oba sladkorja, se glukoza ni porabljala. Minimalno spreminjanje njene koncentracije je bilo verjetno posledica napake pri meritvah. Nastajanje etanola in CO₂ je bilo premosorazmerno porabi sladkorjev. Kvasovke, ki smo jih gojili v prisotnosti glukoze in fruktoze (Slika 8), in kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču s fruktozo (Slika 7), so proizvedle več etanola in CO₂ kot kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z glukozo (Slika 6).



Slika 6: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 1842 v gojišču CDM z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l. Prikazana je poraba glukoze (-♦-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) med 43 dnevno fermentacijo. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.



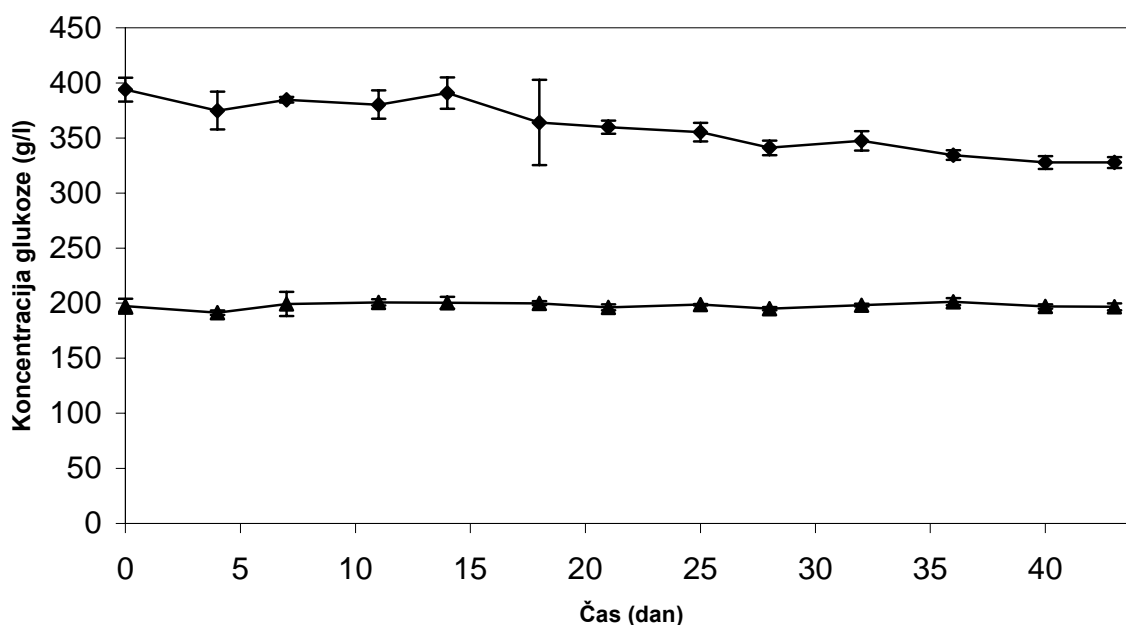
Slika 7: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 1842 v gojišču CDM z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l. Prikazana je poraba fruktoze (-■-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) med 43 dnevno fermentacijo. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.



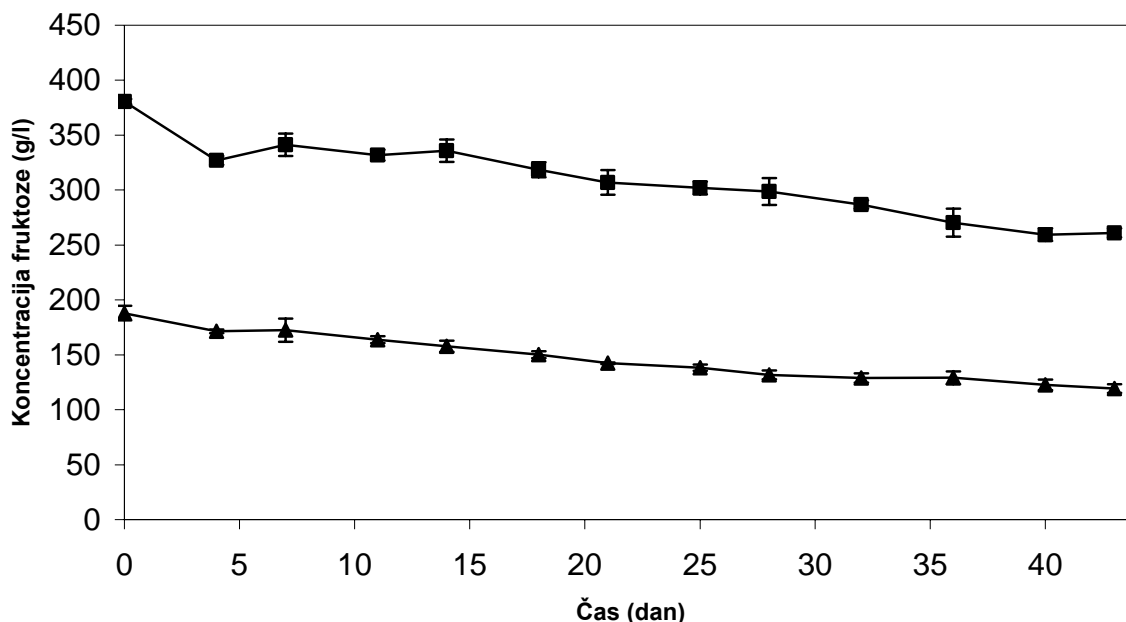
Slika 8: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 1842 v gojišču CDM z začetnimi koncentracijami glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Prikazana je poraba glukoze (-◆-) in fruktoze (-■-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) med 43 dnevno fermentacijo. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

4.1.5 Dinamika porabe sladkorjev v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza

Med samim poskusom nas je zanimala dinamika porabe glukoze in fruktoze. Iz naklonov krivulj (Sliki 9 in 10) vidimo, da se je fruktoza porabljala hitreje kot glukoza. Če primerjamo krivuljo, ki predstavlja porabo glukoze v gojišču CDM z začetnimi koncentracijami glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l (Slika 9), s krivuljo, ki predstavlja porabo fruktoze v istem gojišču (Slika 10), opazimo, da so kvasovke porabile več fruktoze kot glukoze. Poraba glukoze je bila minimalna oziroma je bila v okviru standardne napake. Glukoza kot edini vir sladkorjev v gojišču se je porabljala (Slika 9), vendar počasneje kot fruktoza v gojišču s čisto fruktozo (Slika 10).



Slika 9: Poraba glukoze med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-♦-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

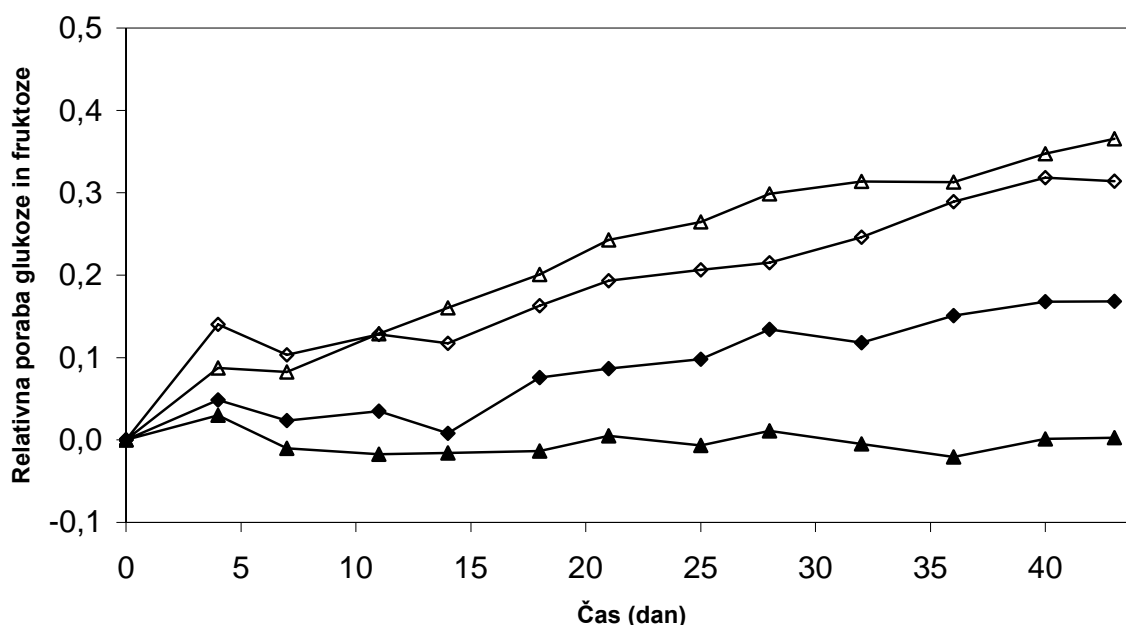


Slika 10: Poraba fruktoze med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

V preglednici 2 in na sliki 11 je predstavljena relativna poraba glukoze in fruktoze med alkoholno fermentacijo CDM s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. V gojišču, ki je na začetku vsebovalo 400 g/l glukoze, se je le-te porabilo 16,8 %. V gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l se je le-te porabilo 31,4 %. V gojišču, ki je na začetku vsebovalo 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze, se je slednje porabilo 17,8 %. Poraba glukoze v prisotnosti fruktoze je bila minimalna, oziroma je bila poraba navidezna in je bila posledica napake pri meritvah. Več fruktoze je bilo porabljen v gojišču z začetno koncentracijo 400 g/l, in sicer za 13,6 % več, kot pa v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 200 g/l. Skupna relativna poraba sladkorjev je bila najvišja v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l (31,4 %). Po relativni porabi sladkorjev je sledilo gojišče, ki je vsebovalo glukozo in fruktozo. Skupno se je porabilo 18,0 % sladkorjev. Nato pa še gojišče z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l, kjer se je porabilo 16,8 % sladkorjev. Na grafu (Slika 11) opazimo, da se je najhitreje porabljal fruktoza v gojišču z začetno koncentracijo 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze. Po hitrosti porabe ji je sledila fruktoza v gojišču z začetno koncentracijo 400 g/l fruktoze, potem pa še glukoza iz gojišča z začetno koncentracijo 400 g/l glukoze.

Preglednica 2: Poraba in relativna poraba sladkorjev v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza po 43-dnevni fermentaciji s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Rezultati so izračunani glede na začetne in končne koncentracije sladkorjev v gojiščih in so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Koncentracija glc/fru (g/l)	Glukoza		Fruktoza		Glukoza in fruktoza	
	Poraba (g/l)	Poraba (%)	Poraba (g/l)	Poraba (%)	Poraba (g/l)	Poraba (%)
400/0	66,2	16,8	/	/	/	/
0/400	/	/	119,5	31,4	/	/
200/200	0,6	0,2	68,7	17,8	69,3	18,0



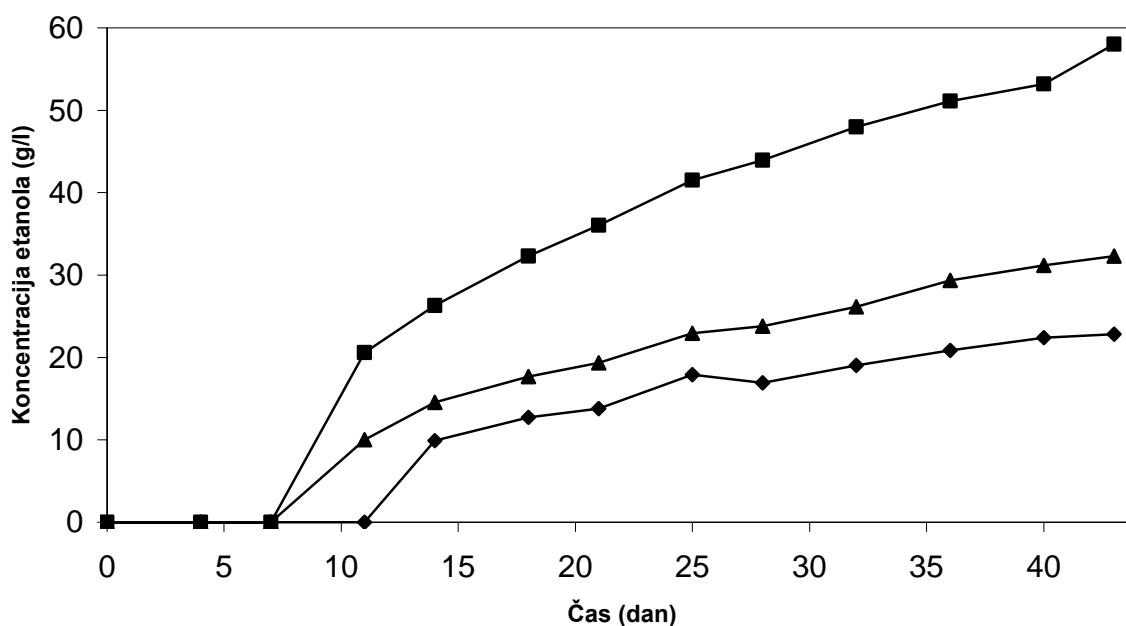
Slika 11: Relativna poraba sladkorjev v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza med fermentacijo s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-♦-); 400 g/l fruktoze (-◇-); 200 g/l glukoze (-▲-); 200 g/l fruktoze (-△-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

4.1.6 Dinamika tvorbe metabolnih produktov v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza

Med alkoholno fermentacijo gojišč CDM smo spremljali tudi dinamiko tvorbe etanola, glicerola in oetne kisline.

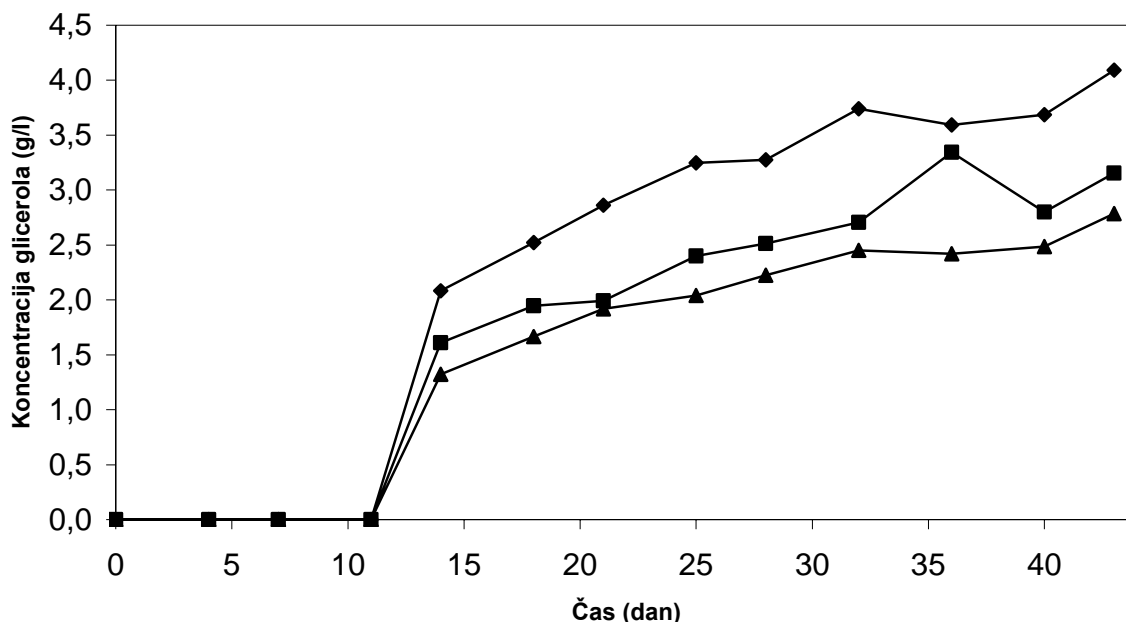
Etanol se je v zaznavnih količinah začel sintetizirati komaj po 7 ali 11 dneh fermentacije (Slika 12). Količina proizvedenega etanola je bila odvisna od koncentracije sladkorjev (predvsem fruktoze), ki so bili prisotni v gojišču. Kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z

začetno koncentracijo 400 g/l fruktoze, so ga sintetizirale največ (približno 60 g/l). Po proizvedeni količini so jim sledile kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetnimi koncentracijami 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze. Te so proizvedle nekaj nad 30 g/l etanola. Najmanj, pa tudi najpočasneje, so etanol sintetizirale kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo 400 g/l glukoze. Proizvedle so nekaj več kot 20 g/l etanola. To je približno dve tretjini manj kot pri kvasovkah, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l.



Slika 12: Sinteza etanola med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-♦-); 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Glicerol se je v vseh fermentorjih začel v zaznavnih količinah sintetizirati komaj po 11 dneh alkoholne fermentacije (Slika 13). Tudi sinteza glicerola je bila odvisna od prisotnega sladkorja in njegove koncentracije v gojišču. Največ (4,1 g/l) so ga sintetizirale kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo 400 g/l glukoze. Po količini proizvedenega glicerola so jim sledile kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo 400 g/l fruktoze. Sintetizirale so 3,2 g/l glicerola. Najmanj glicerola so sintetizirale kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetnimi koncentracijami 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze, in sicer 1,3 g/l oz. skoraj za 32 % manj kot kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l.



Slika 13: Sinteza glicerola med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-♦-); 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Preglednica 3: Masa glicerola (g), ki se je sintetizirala na 1 g porabljenih sladkorjev med fermentacijo gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev in standardni odkloni (SD).

Koncentracija glc/fru (g/l)	Masa nastalega glicerola (g) /g porabljenega sladkorja ± SD
400/0	0,062±0,0059
0/400	0,026±0,0003
200/200	0,039±0,0070

Največ glicerola na 1 g porabljenih sladkorjev so sintetizirale kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l, najmanj pa kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l (Preglednica 3).

Ocetna kislina se je začela v zaznavnih količinah sintetizirati komaj po približno 40 dneh fermentacije. Prisotna je bila v zelo majhnih koncentracijah (Preglednica 4). Najmanj kisline se je sintetiziralo v gojišču CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l, in sicer samo 0,010 g/l. Največ (0,022 g/l) kisline se je sintetiziralo v gojišču z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 400/0 g/l.

Preglednica 4: Koncentracija oetne kisline po 43. dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Koncentracija glc/fru (g/l)	Koncentracija oetne kisline po 43. dneh fermentacije (g/l)
400/0	0,022
0/400	0,020
200/200	0,010

4.1.7 Hitrosti porabe sladkorjev in nastajanja metabolnih produktov ter izkoristki po 43. dneh fermentacije

Po koncu fermentacije smo izračunali tudi nekatere rastne parametre. V preglednici 5 so podane vrednosti specifične hitrosti porabe sladkorjev, specifične hitrosti sinteze metabolnih produktov in maksimalne specifične hitrosti rasti kvasovk v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Najvišjo specifično hitrost porabe sladkorja so dosegle kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo sladkorjev 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze, najnižjo pa kvasovke, gojene v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l. Najnižjo specifično hitrost sinteze etanola so dosegle kvasovke iz gojišča z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l, najvišjo pa kvasovke iz gojišča z začetno koncentracijo glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Najnižjo specifično hitrost sinteze glicerola so dosegle kvasovke iz gojišča z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l, najvišjo pa kvasovke v gojišču z glukozo. Najnižjo specifično hitrost sinteze oetne kisline so dosegle kvasovke iz gojišča z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l, najvišjo pa kvasovke iz gojišča z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l. Najnižjo specifično hitrost sinteze CO₂ so dosegle kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l, najvišjo pa kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Najvišjo maksimalno specifično hitrost rasti so dosegle kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l, najnižjo pa kvasovke iz gojišča z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l.

Preglednica 5: Specifične hitrosti porabe sladkorjev (q_s) in sinteze etanola (q_{EtOH}), glicerola ($q_{glic.}$), oetne kisline ($q_{ocet.k.}$), CO₂ (q_{CO_2}) ter maksimalna specifična hitrost rasti (μ_{max}) po 43. dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Podane so povprečne vrednosti in standardni odkloni (SD). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

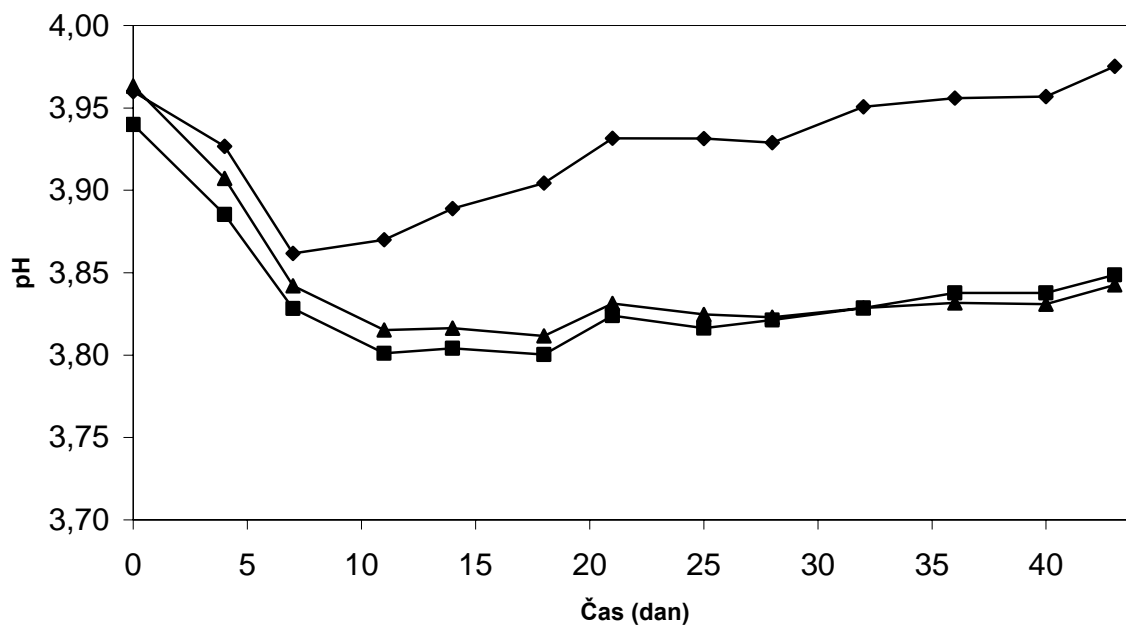
Koncentracija glc/fru (g/l)	400/0	0/400	200/200
$q_s \pm SD$ (g sladk./ g SB /h)	1,04±0,55	0,55±0,16	1,45±1,05
$q_{EtOH} \pm SD$ (g EtOH/ g SB /h)	-0,34±0,14	-0,27±0,09	-0,60±0,26
$q_{glic.} \pm SD$ (g glic./g SB /h)	-0,06±0,0252	-0,02±0,0099	-0,05±0,0234
$q_{ocet.k.} \pm SD$ (g ocet. k./g SB /h)	-0,00034±0,00014	-0,00009±0,00003	-0,00017±0,00006
$q_{CO_2} \pm SD$ (g CO ₂ /g SB/h)	-0,20±0,13	-0,21±0,07	-0,69±0,26
μ_{max} (h ⁻¹)	0,0085±0,0004	0,0081±0,0027	0,0092±0,0006

Preglednica 6: Izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase ($Y_{X/S}$) in sintezo etanola ($Y_{E/S}$) po 43. dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Podane so povprečne vrednosti in standardni odkloni (SD). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Koncentracija glc/fru (g/l)	$Y_{X/S} \pm SD$ (g SB/g sladk.)	$Y_{E/S} \pm SD$ (g EtOH/g sladk.)
400/0	0,0033 \pm 0,0026	0,3471 \pm 0,0346
0/400	0,0018 \pm 0,0005	0,4860 \pm 0,0167
200/200	0,0009 \pm 0,0007	0,4736 \pm 0,1627

Največji izkoristek substrata za tvorbo biomase (Preglednica 6) so imele kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l, najmanjšega pa kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l so imele skoraj za 50 % manjši izkoristek substrata za sintezo biomase kot kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l. Največji izkoristek substrata za sintezo etanola (Preglednica 6) so imele kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo sladkorjev 400 g/l fruktoze. Najmanjši izkoristek substrata za sintezo etanola pa so imele kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l.

4.1.8 Sprememba vrednosti pH gojišča med fermentacijo



Slika 14: Spreminjanje vrednosti pH v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza med fermentacijo s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842: 400 g/l glukoze (-♦-); 400 g/l fruktoze (-■-); 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze (-▲-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Med fermentacijo smo spremljali tudi spreminanje vrednosti pH gojišč (Slika 14). Na začetku procesa so se znižale, potem pa so se začele počasi spet zviševati. V gojišču, kjer je bila prisotna samo glukoza (začetna koncentracija 400 g/l), so se vrednosti pH začele zviševati že po 7 dneh fermentacije in so na koncu procesa dosegle višjo vrednost, kot so jo imele na začetku fermentacije, medtem ko so se začele vrednosti pH v gojiščih, kjer je bila prisotna tudi (začetne koncentracije glukoze in fruktoze 200 g/l) ali samo fruktoza (začetna koncentracija 400 g/l), zviševati komaj po 11 dneh fermentacije. Zviševale so se zelo počasi in do konca fermentacije niso dosegle niti polovice svoje začetne vrednosti.

4.1.9 Specifična aktivnost glikolitičnih encimov

Po 14. dneh in po koncu alkoholne fermentacije smo izmerili aktivnosti treh ključnih glikolitičnih encimov: heksokinaze, fosfofruktokinaze in piruvat kinaze. Iz fermentorjev smo pridobili zelo majhne količine mokre biomase, zato je lahko predvsem pri določanju aktivnosti encimov po 14. dneh fermentacije prišlo do napak.

4.1.9.1 Po 14. dneh fermentacije

Preglednica 7 prikazuje specifične aktivnosti encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) po 14. dneh fermentacije. Specifične aktivnosti so bile pri vseh encimih zelo nizke. Pri kvasovkah, ki smo jih gojili v gojiščih z začetnimi koncentracijami glukoze 400 g/l ter glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l, aktivnosti HXK in PFK niti nismo zaznali. Največjo specifično aktivnost PYK so imele kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l, najmanjšo pa kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l.

Preglednica 7: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) (U/mg) po 14. dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Koncentracija glc/fru (g/l)	HXK (U/mg)			PFK (U/mg)			PYK (U/mg)		
	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)
400/0	0	/	/	0	/	/	$1,4 \cdot 10^{-6}$	$6,2 \cdot 10^{-7}$	43,3
0/400	$3,2 \cdot 10^{-6}$	0	0	$5,4 \cdot 10^{-7}$	0	0	$8,9 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	28,3
200/200	0	/	/	0	/	/	$8,3 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$	24,7

4.1.9.2 Po 43. dneh fermentacije

Preglednica 8 prikazuje specifične aktivnosti encimov HXK, PFK in PYK po 43. dneh alkoholne fermentacije. Tudi ob koncu fermentacije so bile specifične aktivnosti pri vseh encimih zelo nizke. Pri kvasovkah, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze

400 g/l, aktivnosti PFK nismo zaznali. Največjo specifično aktivnost HXK so imele kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l, najmanjšo pa kvasovke, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l. Specifična aktivnost PFK je bila enaka pri kvasovkah, ki smo jih gojili v gojišču z glukozo, in kvasovkah, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Tudi specifična aktivnost PYK je bila enaka pri kvasovkah, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l ter glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l, najmanjša pa je bila pri kvasovkah, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l.

Preglednica 8: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) (U/mg) po 43. dneh fermentacije gojišč CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza s kvasovko *C. stellata* ZIM 1842. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

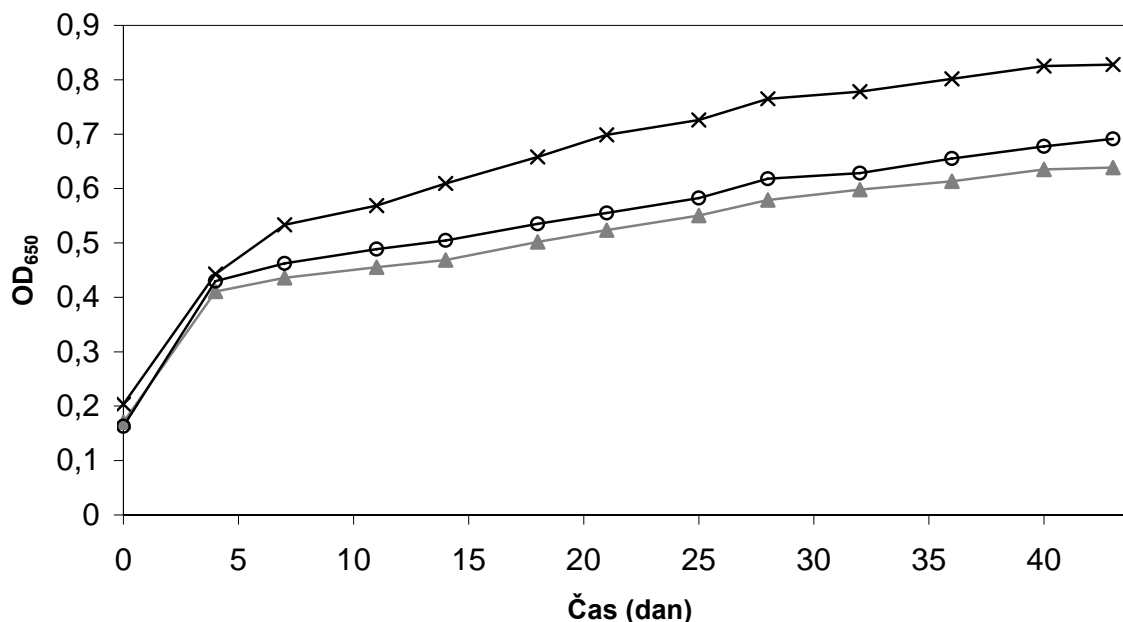
Koncentracija glc/fru (g/l)	HXK (U/mg)			PFK (U/mg)			PYK (U/mg)		
	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)
400/0	$8,9 \cdot 10^{-6}$	0	0	$5,4 \cdot 10^{-7}$	0	0	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$5,4 \cdot 10^{-7}$	50,0
0/400	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	53,5	0	/	/	$8,9 \cdot 10^{-7}$	$3,1 \cdot 10^{-7}$	34,6
200/200	$6,3 \cdot 10^{-5}$	$6,1 \cdot 10^{-6}$	9,6	$5,4 \cdot 10^{-7}$	0	0	$1,1 \cdot 10^{-6}$	0	0

4.2 ALKOHOLNA FERMENTACIJA GOJIŠČA CDM Z MUTANTAMA *Candida stellata* ZIM 2287 IN *Candida stellata* ZIM 2290

4.2.1 Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo

Med fermentacijo smo spremljali vrednosti OD₆₅₀ v gojišču CDM, ki so se spreminjale zaradi rasti kvasovk *C. stellata* ZIM 1842, *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 (Slika 15). V prvih dneh fermentacije smo opazili porast kvasovk, ki se je nadaljeval do približno 30. dne, vendar se je naklon krivulj sčasoma zmanjšal. Najmanjšo povprečno vrednost OD₆₅₀ so dosegle kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842. Največjo povprečno vrednost OD₆₅₀ so dosegle kvasovke *C. stellata* ZIM 2287. Razlika med vrednostmi OD₆₅₀ starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 in seva *C. stellata* ZIM 2290 je bila majhna, medtem ko je sev *C. stellata* ZIM 2287 dosegel precej višjo OD₆₅₀ kot ostala dva.

Iz rezultatov v preglednici 9 razberemo, da je bilo povprečno število vseh celic v 1 ml gojišča bolj ali manj enako v vseh fermentorjih. Razlike so bile bolj očitne pri povprečnem številu kolonijških enot v 1 ml gojišča in pri odstotku živosti. Največje število CFU/ml so imele kvasovke seva *C. stellata* ZIM 2287. Pri teh kvasovkah smo opazili tudi največji odstotek živosti (kar 59 %). Sledile so jim kvasovke seva *C. stellata* ZIM 2290 s 35 % živostjo. Najmanjše število CFU/ml in najmanjši odstotek živosti (samo 0,1 %) pa je imel starševski sev *C. stellata* ZIM 1842.



Slika 15: Spreminjanje vrednosti OD₆₅₀ med fermentacijo zaradi rasti sevov kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (▲; —), ZIM 2287 (×; —) in ZIM 2290 (○; —) v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

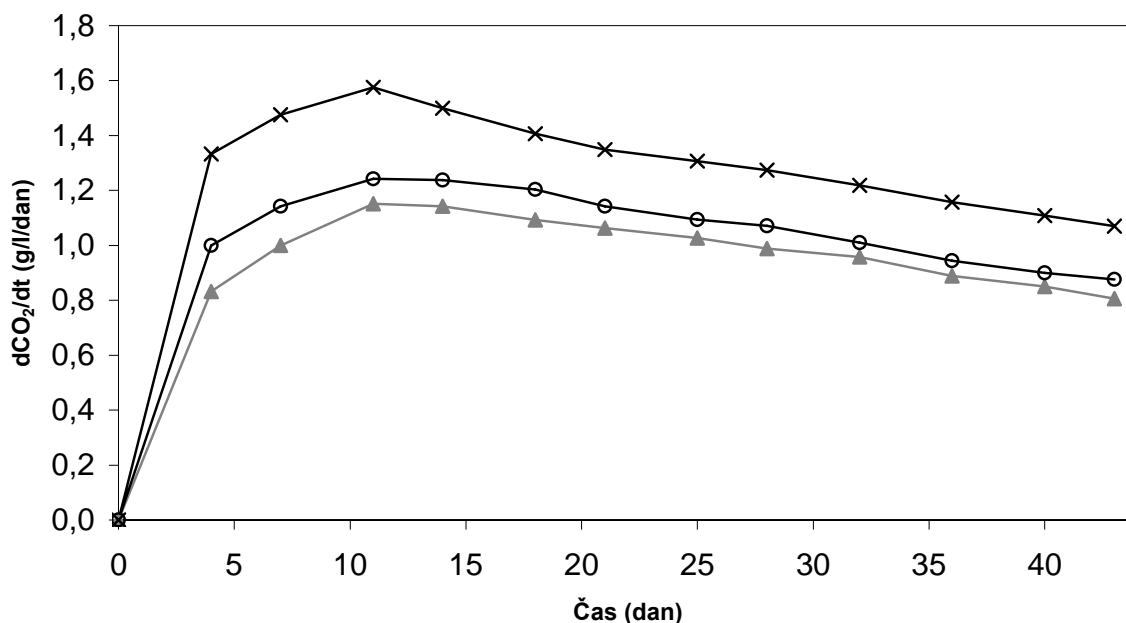
Preglednica 9: Število kolonijskih enot v 1 ml gojišča (CFU/ml) in ocena živosti kvasovk po končani 43-dnevni fermentaciji gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

	Hemocitometer	YM plošče	
Sev <i>C. stellata</i>	Št. vseh celic*10 ⁷ /ml	Št. CFU/ml	Živost (%)
ZIM 1842 *	3,2	2,3*10 ⁴	0,1
ZIM 2287	3,0	1,8*10 ⁷	59
ZIM 2290	3,0	1,1*10 ⁷	35

4.2.2 Sproščanje ogljikovega dioksida (CO₂)

Med poskusom smo fermentorje tudi tehtali. S tem smo spremljali sproščanje CO₂ med alkoholno fermentacijo zaradi rasti kvasovk *C. stellata* ZIM 1842, *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 (Slika 16). Vsi fermentorji so imeli podoben vzorec, le da so bile količine sproščenega CO₂ pri različnih sevih različne. V približno štirih dneh se je pri vseh fermentorjih količina sproščenega CO₂ močno povečala. Naklon krivulje se je nato zmanjšal, vendar je bil še vedno pozitiven do približno 11. dne fermentacije. Nato je začela tvorba CO₂ upadati. Največje količine CO₂ so tvorile kvasovke seva *C. stellata* ZIM 2287. Po količini

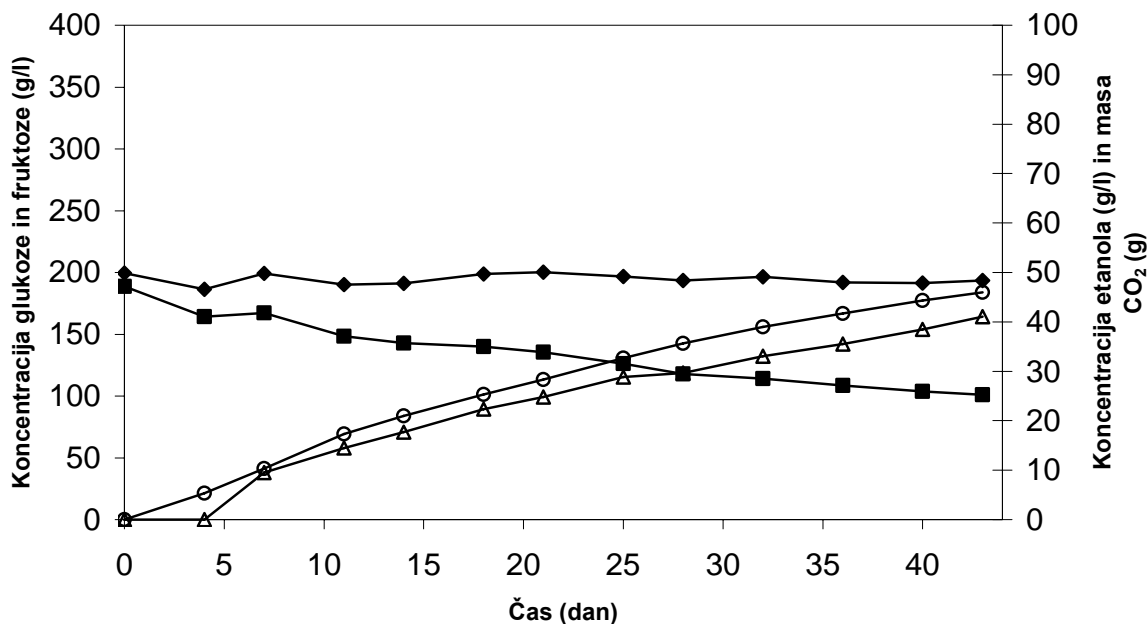
sintetiziranega CO₂ so jim sledile najprej kvasovke seva *C. stellata* ZIM 2290, nato pa še kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842.



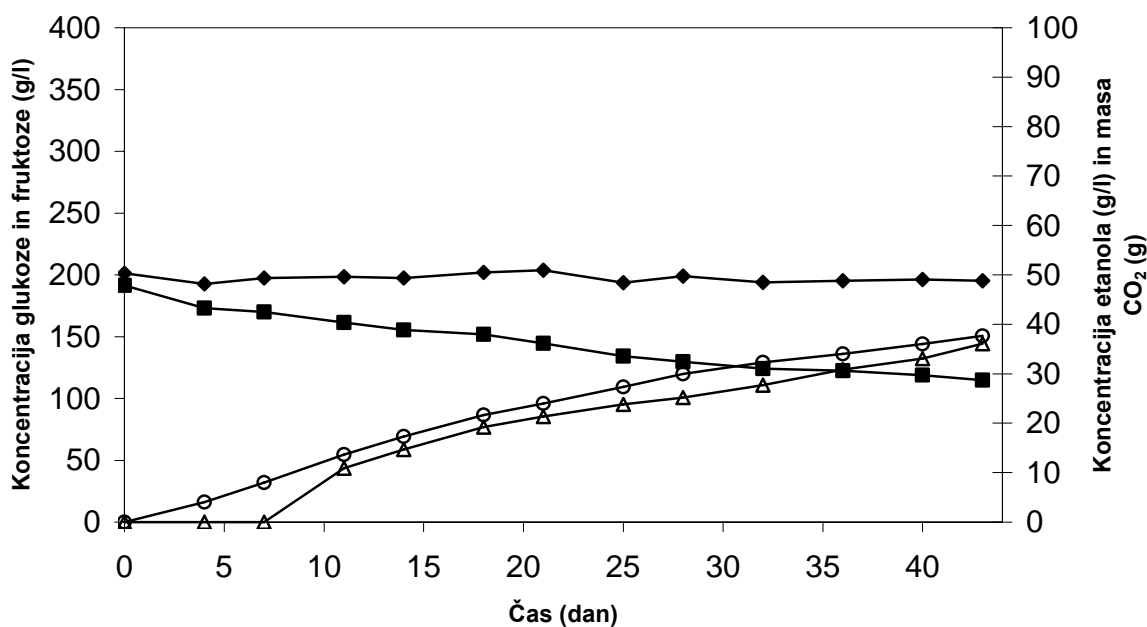
Slika 16: dCO_2/dt med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-x-) in ZIM 2290 (-o-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

4.2.3 Fermentacijski profili

Na slikah 8, 17 in 18 so združene krivulje, ki ponazarjajo porabo glukoze in fruktoze ter tvorbo etanola in CO₂ med alkoholno fermentacijo CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s kvasovkami *C. stellata* ZIM 1842, *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290. Če primerjamo porabo glukoze s porabo fruktoze vidimo, da se glukoza ni porabljala. Minimalno spreminjanje koncentracije je bilo posledica napake pri meritvah. Nastajanje etanola in CO₂ je bilo premosorazmerno porabi sladkorjev. Kvasovke *C. stellata* ZIM 2287 (Slika 17) so proizvedle največ etanola in CO₂. Tudi sinteza je bila najhitrejša ravno pri tem sevu. Najmanj etanola in CO₂ so proizvedle kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 (Slika 8).



Slika 17: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 2287 v gojišču CDM z začetnimi koncentracijami glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Prikazana je poraba glukoze (-♦-) in fruktoze (-■-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) v 43 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

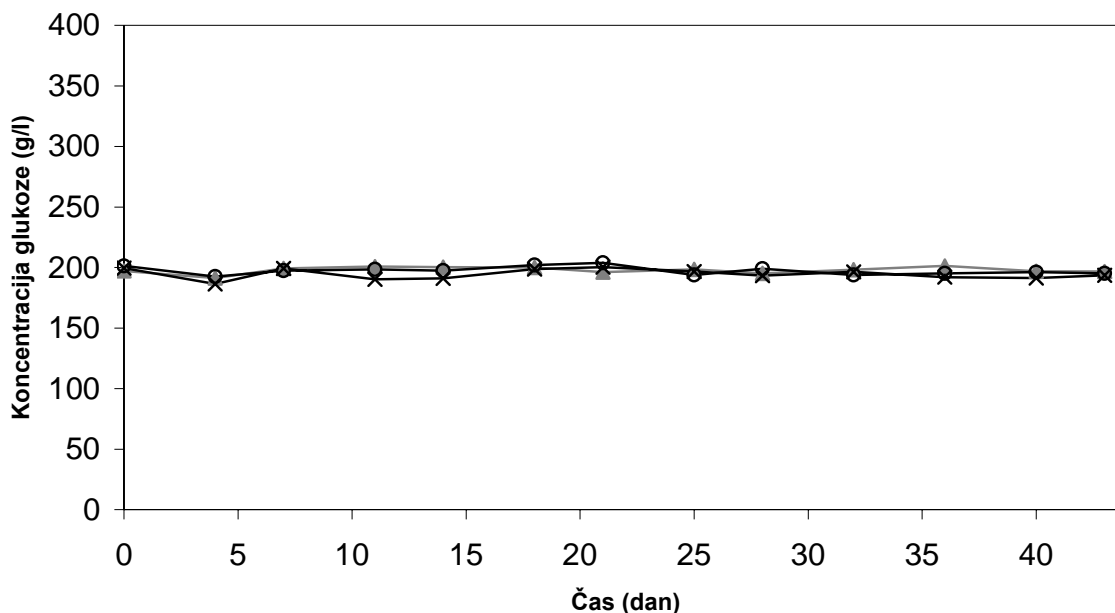


Slika 18: Fermentacijski profil za kvasovko *C. stellata* ZIM 2290 v gojišču CDM z začetnimi koncentracijami glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l. Prikazana je poraba glukoze (-♦-) in fruktoze (-■-) ter tvorba etanola (-Δ-) in CO₂ (-○-) v 43 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

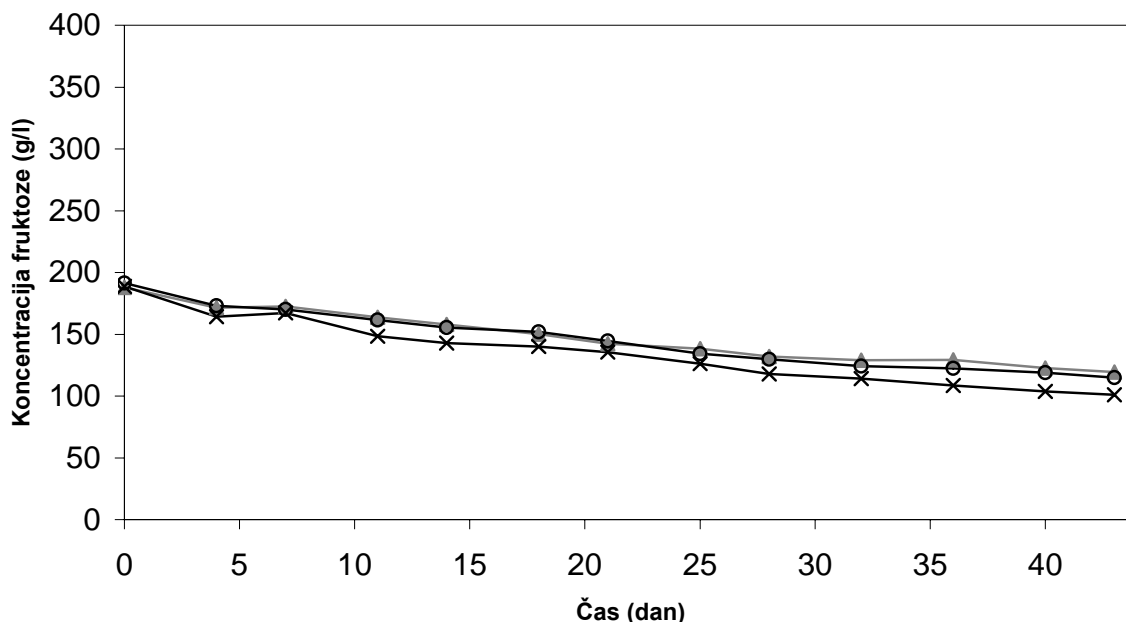
4.2.4 Dinamika porabe sladkorjev ob fermentaciji gojišča CDM z mutantama *Candida stellata* ZIM 2287 in *Candida stellata* ZIM 2290

Med samim poskusom nas je zanimala dinamika porabe glukoze in fruktoze. Iz naklonov krivulj (Sliki 19 in 20) vidimo, da se je fruktoza porabljala hitreje kot glukoza. Poraba glukoze v gojiščih je bila minimalna, oziroma je bila v okviru standardne napake.

V preglednici 10 in na sliki 21 je predstavljena relativna poraba glukoze in fruktoze med fermentacijo. Vsi sevi kvasovke *C. stellata* so v gojiščih CDM z začetno koncentracijo glukoze 200 g/l in fruktoze 200 g/l porabili vsaj za 17,6 % več fruktoze kot glukoze. Kvasovke *C. stellata* ZIM 2290 so porabile največ glukoze (1,6 %), kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 pa najmanj (0,2 %). Med fermentacijo so največ fruktoze porabile kvasovke *C. stellata* ZIM 2287 (22,6 %), najmanj pa kvasovke starševskega seva (17,8 %). Največjo porabo obeh sladkorjev so imele kvasovke seva *C. stellata* ZIM 2287 (24,1 %), najmanjšo pa kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 (18,0 %). Na grafu (Slika 21) opazimo, da se je najhitreje porabljala fruktoza v gojišču s kvasovkami *C. stellata* ZIM 2287, najpočasneje pa fruktoza v gojišču s kvasovkami starševskega seva. Poraba glukoze je bila pri vseh treh sevih minimalna, oziroma je bila posledica standardne napake meritev.



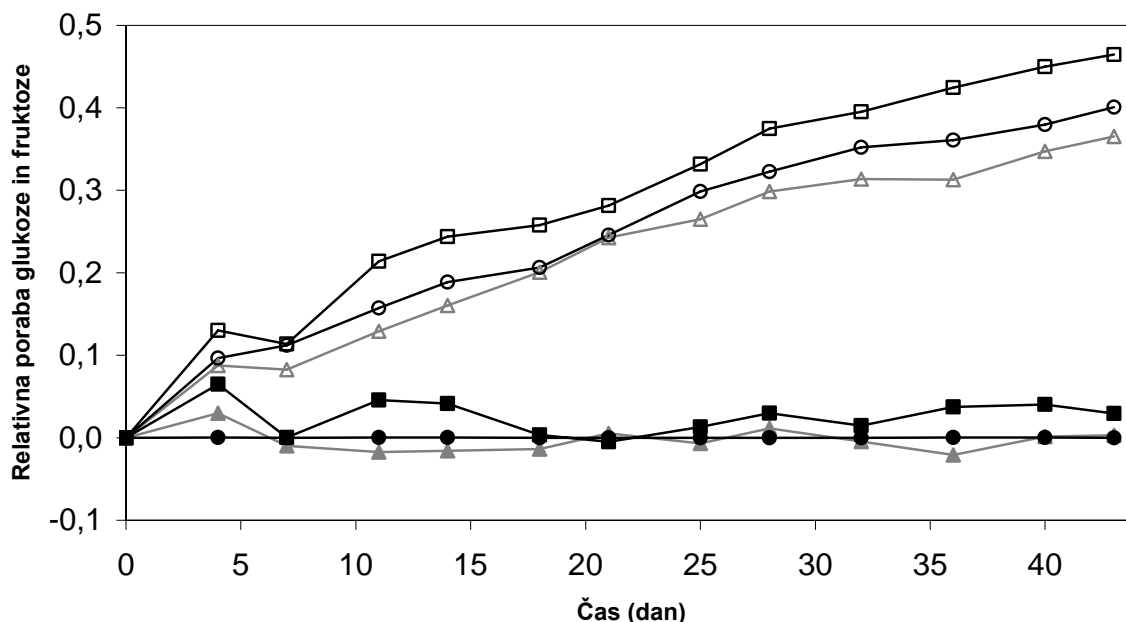
Slika 19: Poraba glukoze med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-x-) in ZIM 2290 (-o-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.



Slika 20: Poraba fruktoze med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-×-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Preglednica 10: Poraba in relativna poraba sladkorjev v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l po 43-dnevni fermentaciji s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so izračunani glede na začetne in končne koncentracije sladkorjev v gojiščih in so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev <i>C. stellata</i>	Glukoza		Fruktoza		Glukoza in fruktoza	
	Poraba (g/l)	Poraba (%)	Poraba (g/l)	Poraba (%)	Poraba (g/l)	Poraba (%)
ZIM 1842 *	0,6	0,2	68,7	17,8	69,3	18,0
ZIM 2287	5,9	1,5	87,7	22,6	93,6	24,1
ZIM 2290	6,3	1,6	76,8	19,5	83,1	21,1

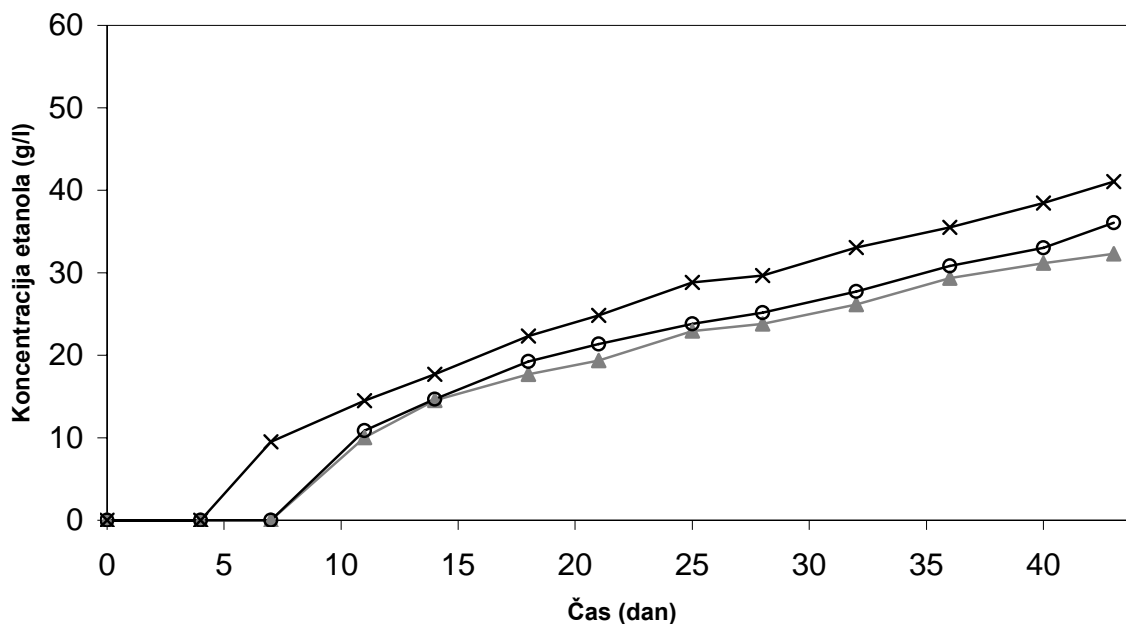


Slika 21: Relativna poraba sladkorjev v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l med fermentacijo s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev), ZIM 2287 in ZIM 2290: *C. stellata* ZIM 1842 in glukoza (-▲-); *C. stellata* ZIM 1842 in fruktoza (-△-); *C. stellata* ZIM 2287 in glukoza (-■-); *C. stellata* ZIM 2287 in fruktoza (-□-); *C. stellata* ZIM 2290 in glukoza (-●-); *C. stellata* ZIM 2290 in fruktoza (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

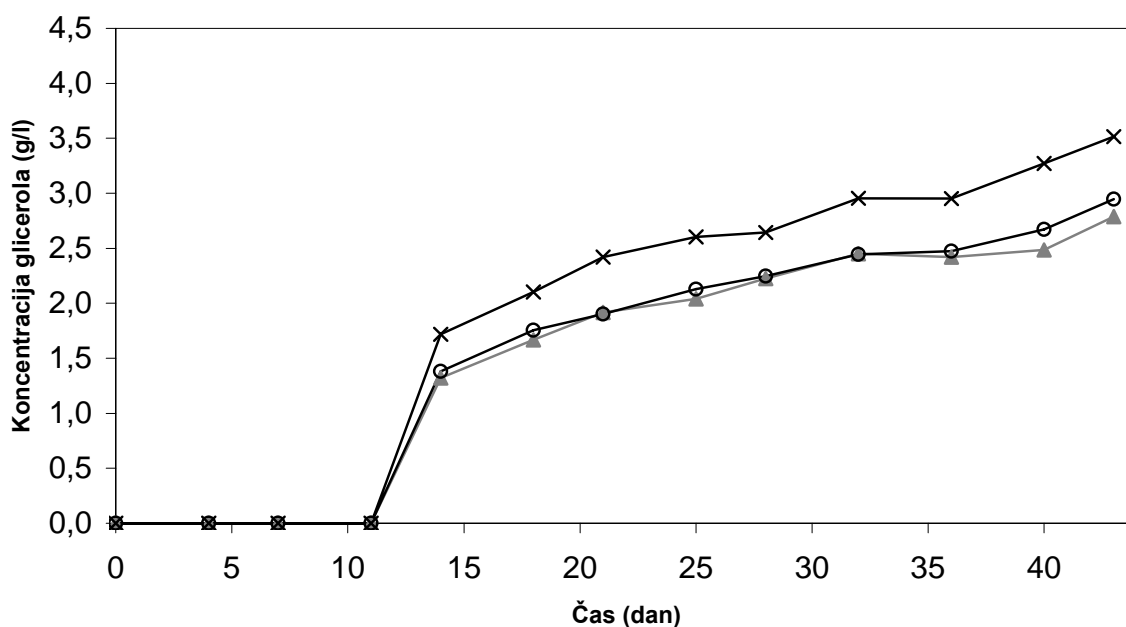
4.2.5 Dinamika tvorbe metabolnih produktov ob fermentaciji gojišča CDM z mutantama *Candida stellata* ZIM 2287 in *Candida stellata* ZIM 2290

Med fermentacijo smo v gojiščih CDM spremljali dinamiko tvorbe etanola, glicerola in očetne kisline.

Količina proizvedenega etanola je bila odvisna od seva kvasovke *C. stellata*, ki smo ga uporabili pri fermentaciji (Slika 22). V fermentorjih, kjer smo gojili kvasovko *C. stellata* ZIM 2287, se je začel etanol v zaznavni količini sintetizirati že po 4 dneh, pri ostalih dveh sevih pa šele po 7 dneh fermentacije. Koncentracija etanola je v vseh gojiščih najprej strmo narasla, potem pa se je hitrost sinteze etanola počasi umirila in njegova koncentracija se je povečevala počasneje. Kvasovke *C. stellata* ZIM 2287 so etanol proizvajale najhitreje in ga tudi največ proizvedle (kar 41 g/l). Kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 so sintetizirale najmanj etanola (približno 32 g/l), saj je bila hitrost njegove sinteze najpočasnejša ravno pri tem sevu. *C. stellata* ZIM 2290 je proizvedla dobrih 36 g/l etanola.



Slika 22: Sinteza etanola med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-x-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.



Slika 23: Sinteza glicerola med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-x-) in ZIM 2290 (-○-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

V vseh fermentorjih se je začel glicerol v zaznavni količini sintetizirati komaj po 11 dneh gojenja (Slika 23). Njegova koncentracija se je tako kot pri etanolu (Slika 22) najprej močno povečala, potem se je njegova sinteza upočasnila, kar je imelo za posledico tudi počasnejše naraščanje koncentracije glicerola v gojišču. Opazimo, da je bila sinteza glicerola odvisna od seva kvasovke *C. stellata*, ki smo ga uporabili pri poskusu. Največ (3,5 g/l) so ga tvorile kvasovke *C. stellata* ZIM 2287. Po količini proizvedenega glicerola so jim sledile kvasovke *C. stellata* ZIM 2290. Sintetizirale so ga 3,0 g/l. Najmanj glicerola so sintetizirale kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 (2,8 g/l). Sinteza glicerola pri sevih *C. stellata* ZIM 1842 in *C. stellata* ZIM 2290 je bila skoraj med celotno fermentacijo približno enako hitra. Po približno 32 dneh gojenja je postala njegova sinteza hitrejša pri mutanti *C. stellata* ZIM 2290.

Preglednica 11: Masa glicerola (g), ki se je sintetizirala na 1 g porabljenih sladkorjev med fermentacijo gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l z različnimi sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev in standardni odkloni (SD).

Sev <i>C. stellata</i>	Masa nastalega glicerola (g) /g porabljenega sladkorja ± SD
ZIM 1842 *	0,039±0,0070
ZIM 2287	0,039±0,0137
ZIM 2290	0,036±0,0084

Kvasovke *C. stellata* ZIM 1842 in *C. stellata* ZIM 2287 so sintetizirale enake količine glicerola na 1 g porabljenih sladkorjev. Kvasovke *C. stellata* ZIM 2290 so ga sintetizirale manj (Preglednica 11).

Ocetna kislina se je začela v zaznavni količini sintetizirati komaj po približno 40 dneh fermentacije (Preglednica 12). Sintetizirale se jo samo kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842. Prisotna je bila v zelo majhnih koncentracijah (0,010 g/l). Ostala dva seva kisline nista sintetizirala v zaznavnih koncentracijah.

Preglednica 12: Koncentracija očetne kisline po 43. dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev <i>C. stellata</i>	Koncentracija očetne kisline po 43 dneh fermentacije (g/l)
ZIM 1842 *	0,010
ZIM 2287	0
ZIM 2290	0

4.2.6 Hitrosti porabe sladkorjev in nastajanja metabolnih produktov ter izkoristki po 43. dneh fermentacije

Po koncu fermentacije smo izračunali tudi nekatere rastne parametre. V preglednici 13 so podane specifične hitrosti porabe sladkorjev, specifične hitrosti sinteze metabolnih produktov in maksimalne specifične hitrosti rasti kvasovk v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l za seve kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842, ZIM 2287 in ZIM 2290. Najvišjo specifično hitrost porabe sladkorja so dosegle kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842, najnižjo pa kvasovke *C. stellata* ZIM 2287. Najnižjo specifično hitrost sinteze etanola, glicerola in CO₂ so dosegle kvasovke *C. stellata* ZIM 2290, najvišjo pa kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842. Ocetno kislino je v zaznavni količini tvoril samo starševski sev. Najvišjo maksimalno specifično hitrost rasti so dosegle kvasovke *C. stellata* ZIM 2290, najnižjo pa kvasovke *C. stellata* ZIM 2287.

Preglednica 13: Specifične hitrosti porabe sladkorjev (q_s) in sinteze etanola (q_{EtOH}), glicerola ($q_{glic.}$), očetne kisline ($q_{ocet.k.}$), CO₂ (q_{CO_2}) ter maksimalna specifična hitrost rasti (μ_{max}) po 43. dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Podane so povprečne vrednosti in standardni odklon (SD). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev <i>C. stellata</i>	ZIM 1842 *	ZIM 2287	ZIM 2290
$q_s \pm SD$ (g sladk./ g SB /h)	1,45±1,05	0,23±0,003	0,36±0,08
$q_{EtOH} \pm SD$ (g EtOH/ g SB /h)	-0,60±0,26	-0,20±0,12	-0,16±0,05
$q_{glic.} \pm SD$ (g glic./g SB /h)	-0,05±0,0234	-0,02±0,0099	-0,01±0,0040
$q_{ocet.k.} \pm SD$ (g ocet. k./g SB /h)	-0,00017±0,00006	0	0
$q_{CO_2} \pm SD$ (g CO ₂ /g SB/h)	-0,69±0,26	-0,23±0,14	-0,17±0,07
μ_{max}	0,0092±0,0006	0,0081±0,0002	0,0101±0,0005

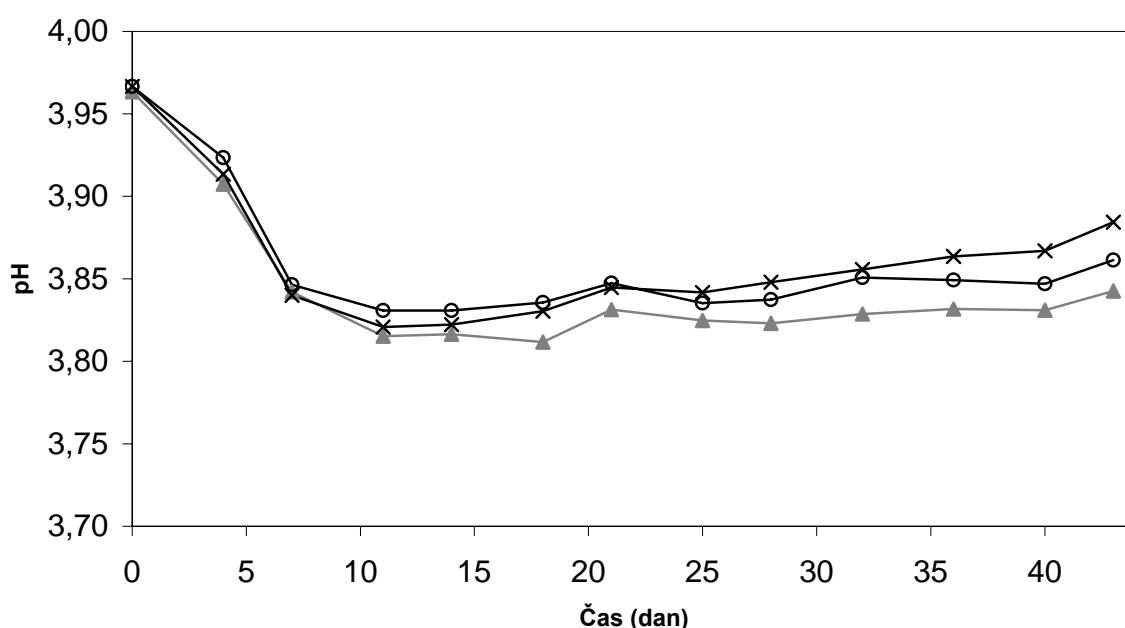
Preglednica 14: Izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase ($Y_{X/S}$) in sintezo etanola ($Y_{E/S}$) po 43. dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Podane so povprečne vrednosti in standardni odkloni (SD). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev <i>C. stellata</i>	$Y_{X/S} \pm SD$ (g SB/g sladk.)	$Y_{E/S} \pm SD$ (g EtOH/g sladk.)
ZIM 1842 *	0,0009±0,0007	0,4736±0,1627
ZIM 2287	0,0031±0,0019	0,5243±0,2835
ZIM 2290	0,0027±0,0006	0,4589±0,1311

Največji izkoristek substrata za tvorbo biomase so imele kvasovke *C. stellata* ZIM 2287, najmanjšega pa kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 (Preglednica 14). Izkoristki substrata za sintezo etanola se med sevi, ki smo ji uporabili pri poskusu, niso zelo razlikovali. Največji izkoristek so imele spet kvasovke seva *C. stellata* ZIM 2287, najmanjšega pa kvasovke *C. stellata* ZIM 2290.

4.2.7 Sprememba vrednosti pH gojišča med alkoholno fermentacijo

Med fermentacijo smo spremljali tudi spreminjanje vrednosti pH gojišč (Slika 24). Pri vseh treh sevih kvasovke *C. stellata*, ki smo jih uporabili pri poskusu, smo opazili podobno spreminjanje vrednosti pH gojišča (Slika 24). Vrednosti pH so se na začetku fermentacije znižale, potem pa so začele po 11 dneh fermentacije počasi spet naraščati. V gojišču, kjer smo gojili kvasovke *C. stellata* ZIM 2287, vrednosti pH naraščajo najhitreje, medtem ko v gojiščih, kjer smo gojili kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842, naraščajo najpočasneje.



Slika 24: Spreminjanje vrednosti pH v gojiščih CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l med fermentacijo s sevi kvasovke *C. stellata* ZIM 1842 (starševski sev) (-▲-), ZIM 2287 (-x-) in ZIM 2290 (-o-). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

4.2.8 Specifična aktivnost glikolitičnih encimov

Po 14. dneh in po koncu alkoholne fermentacije smo izmerili aktivnosti treh ključnih glikolitičnih encimov: heksokinaze, fosfofruktokinaze in piruvat kinaze. Iz fermentorjev smo pridobili zelo majhne količine mokre biomase, zato je lahko predvsem pri določanju aktivnosti encimov po 14. dneh fermentacije prišlo do napak.

4.2.8.1 Po 14. dneh fermentacije

Preglednica 15 prikazuje specifične aktivnosti encimov HXK, PFK in PYK po 14. dneh fermentacije. Specifične aktivnosti so bile pri vseh encimih zelo nizke. Aktivnosti HXK nismo zaznali pri nobenem sevu kvasovk, ki smo jih uporabili pri poskusu. Prav tako nismo zaznali aktivnosti PFK pri kvasovkah starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842. Specifična aktivnost PFK kvasovk *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 je bila enaka. Največjo specifično aktivnost PYK so imele kvasovke *C. stellata* ZIM 1842, najmanjšo pa kvasovke *C. stellata* ZIM 2290.

Preglednica 15: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) (U/mg) po 14. dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev <i>C. stellata</i>	HXK (U/mg)			PFK (U/mg)			PYK (U/mg)		
	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)
ZIM 1842 *	0	/	/	0	/	/	$8,3 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$	24,7
ZIM 2287	0	/	/	$5,4 \cdot 10^{-7}$	0	0	$6,0 \cdot 10^{-7}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$	34,6
ZIM 2290	0	/	/	$5,4 \cdot 10^{-7}$	0	0	$5,3 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^{-7}$	47,1

4.2.8.2 Po 43. dneh fermentacije

Preglednica 16 prikazuje specifične aktivnosti encimov HXK, PFK in PYK po 43. dneh alkoholne fermentacije. Tudi ob koncu fermentacije so bile specifične aktivnosti pri vseh encimih zelo nizke. Pri kvasovkah *C. stellata* ZIM 2287 aktivnosti PFK nismo zaznali. Kvasovke starševskega seva *C. stellata* ZIM 1842 so imele večjo specifično aktivnost HXK kot kvasovke *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 (pri teh dveh sevih je bila specifična aktivnost HXK namreč enaka). Specifična aktivnost PFK kvasovk *C. stellata* ZIM 1842 in *C. stellata* ZIM 2290 je bila enaka. Največjo specifično aktivnost PYK so imele kvasovke *C. stellata* ZIM 2287, najmanjšo pa kvasovke starševskega seva.

Preglednica 16: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), fosforuktokinaze (PFK) in piruvat kinaze (PYK) (U/mg) po 43. dneh fermentacije gojišč CDM z začetnim razmerjem glukoza/fruktoza 200/200 g/l s sevi kvasovke *C. stellata*: ZIM 1842 (starševski sev (*)), ZIM 2287 in ZIM 2290. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev <i>C. stellata</i>	HXK (U/mg)			PFK (U/mg)			PYK (U/mg)		
	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)
ZIM 1842 *	$6,3 \cdot 10^{-5}$	$6,1 \cdot 10^{-6}$	9,6	$5,4 \cdot 10^{-7}$	0	0	$1,1 \cdot 10^{-6}$	0	0
ZIM 2287	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-6}$	41,6	0	/	/	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	50,0
ZIM 2290	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$9,3 \cdot 10^{-6}$	85,8	$5,4 \cdot 10^{-7}$	0	0	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-7}$	24,7

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Pogosto se zgodi, da pri proizvodnji vina pride do predčasne zaustavitve fermentacije (Henschke in Jiranek, 1992). Nastanejo vina, ki vsebujejo previsoke koncentracije reducirajočih sladkorjev in prenizke koncentracije etanola (Berthels in sod., 2004). Potrebne so analize, ki bi razjasnile vzroke za te težave. Če bi lahko z analizo mošta pravočasno ugotovili nepravilen potek fermentacije, bi lahko preprečili njeno predčasno zaustavitev (Urtubia in sod., 2007). Eden izmed vzrokov je prenizko razmerje glukoza/fruktoza oziroma previsoka koncentracija fruktoze v moštu, ki lahko z različnimi mehanizmi vpliva na potek fermentacije (Schütz in Gafner, 1993; Berthels in sod, 2004).

Na podlagi delovne hipoteze, da kvasovka *Candida stellata* s prednostno porabo fruktoze iz mošta prepreči preveliko znižanje razmerja glukoza/fruktoza, smo skušali dokazati hitrejšo porabo fruktoze iz gojišča. Preverili smo tudi fermentacijsko sposobnost dveh mutiranih sevov kvasovke *C. stellata*. Med fermentacijo nas je zanimala poraba sladkorjev glukoze in fruktoze, sinteza nekaterih metabolitov in specifična aktivnost treh ključnih glikolitičnih encimov.

5.1 FERMENTACIJA KEMIJSKO DEFINIRANEGA MOŠTA (CDM) S ČISTO KULTURO KVASOVKE *Candida stellata* ZIM 1842

Za vcepke smo namnožili čisto kulturo kvasovke *Candida stellata* ZIM 1842 v kemijsko definiranem moštu (CDM) s skupno vsebnostjo glukoze in fruktoze 20 g/l (glej poglavje Material in metode 3.3.1.1). Za namnoževanje vcepka smo uporabili CDM z manjšo vsebnostjo sladkorjev, ker višje koncentracije sladkorjev negativno vplivajo na metabolizem in razmnoževanje kvasovk (Martínez de Marañón in sod., 2001), kar vidimo tudi na sliki 3.

Na enak način smo za vcepke namnožili tudi čiste kulture mutiranih sevov *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290.

5.1.1 Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo in sproščanje CO₂

Vrednost OD₆₅₀ se je med fermentacijo povečevala skladno z rastjo kvasovk in povečevanjem števila celic (Slika 4), čeprav merjenje optične gostote ne pokaže dejanskega števila živih celic v moštu, saj zajame tudi nežive delce. Krivulje so imele značilno obliko rastne krivulje mikroorganizmov (Madigan in sod., 2003). Faze prilagajanja na začetku fermentacije nismo opazili, ker smo drugič vzorčili komaj po 4 dneh fermentacije, ko so celice že bile v eksponentni fazi rasti. Le-ta je pri kvasovkah, ki smo jih gojili v gojišču z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l, trajala do približno 7. dne fermentacije, medtem ko je pri kvasovkah, ki smo jih gojili v ostalih dveh gojiščih, trajala približno do 4. dne fermentacije. Po 4. oziroma 7. dnevu fermentacije so kvasovke počasi vstopile v stacionarno fazo rasti.

Število celic se je še vedno povečevalo, čeprav precej počasneje. Po 40 dneh fermentacije pa lahko pri kvasovkah v gojiščih z začetnimi koncentracijami glukoze 400 g/l in fruktoze 400 g/l opazimo celo začetek faze odmiranja celic, ko so se vrednosti OD₆₅₀ začele zmanjševati. Kvasovke so bile metabolno najbolj aktivne med 4. in 17. dnem fermentacije, kar je razvidno iz količine proizvedenega CO₂ (Slika 5), ki se je povečevala do 11. dne fermentacije. To sovпада z začetkom stacionarne faze rasti, ko hitrost fermentacije doseže svojo najvišjo vrednost (Kunkee in Bisson, 1993). Največ CO₂ se je sprostil iz fermentorjev, v katerih smo gojili kvasovke v gojišču s fruktozo. Te kvasovke so dosegle tudi najvišjo povprečno vrednost OD₆₅₀, iz česar lahko sklepamo, da so dosegle najvišje število celic med fermentacijo. Glede na količino sproščenega CO₂ so bile najmanj metabolno aktivne kvasovke, ki so rasle v gojišču z glukozo.

Kvasovke so v vseh treh gojiščih po 43. dneh alkoholne fermentacije dosegle približno enako končno število vseh celic/ml gojišča CDM (Preglednica 1). Med fermentacijo mošta v vino se populacija kvasovk običajno poveča z 10⁴-10⁶ CFU/ml na 10⁸-10⁹ CFU/ml (Fleet in Heard, 1992). Pri našem poskusu so se celice namnožile le do 10⁶ CFU/ml. Odstotek živosti in število CFU/ml sta se zmanjševala s povečevanjem vsebnosti fruktoze v gojiščih, kar je ravno obratno, če primerjamo z metabolno aktivnostjo (Slika 5), ki se je s povečevanjem deleža fruktoze v gojišču povečevala. Torej lahko zaključimo, da so se kvasovke v vseh gojiščih namnožile do približno enakega števila, vendar so bile tekom fermentacije metabolno manj aktivne tiste, ki so rasle v gojiščih z večjim deležem glukoze.

5.1.2. Dinamika porabe sladkorjev in tvorbe metabolnih produktov v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem sladkorjev glukoze in fruktoze

Alkoholna fermentacija je potekala v treh gojiščih, ki so se med seboj razlikovala v začetnem razmerju sladkorjev glukoze in fruktoze. V vzorcih, ki smo jih jemali tekom procesa iz posameznih fermentorjev, smo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) določili porabo sladkorjev in tvorbo nekaterih metabolnih produktov (Luparia in sod., 2004). Vsebnost preostalih reducirajočih sladkorjev v gojiščih CDM je po končani fermentaciji znašala med 261 in 328 g/l. To je precej več, kot je značilno za običajno spontano ali vzpodbujeno fermentacijo, ki jo zaključí kvasovka *S. cerevisiae*. Po njen ostane v suhem vinu samo še približno 4 g/l reducirajočih sladkorjev (Šikovec, 1996). Ta razlika je verjetno posledica začetne visoke koncentracije sladkorjev v gojiščih (400 g/l) pri našem poskusu. Naravni mošt iz grozdja, ki je potrgano v polni zrelosti, namreč vsebuje samo med 140 in 260 g/l sladkorjev (Bisson, 1992). Drugi razlog za visoko vsebnost preostalih reducirajočih sladkorjev v gojiščih je posledica fermentacije CDM s kvasovko *C. stellata*, ki ima nižjo fermentativno sposobnost (Ciani in Ferraro, 1996; Povhe Jemec, 2003), in je zato porabila tudi za 46 % manj sladkorjev kot vinska kvasovka *S. cerevisiae* (Prpar, 2006).

Med fermentacijo se je fruktoza porabljala hitreje kot glukoza (Slike 6–10). V gojišču, ki je vsebovalo oba sladkorja, se glukoza ni porabljala (Slika 8). Majhne spremembe v

koncentraciji glukoze so bile posledica napake pri meritvah. Vzrok za hitrejšo porabo fruktoze med fermentacijo je verjetno različna afiniteta prenašalcev do posameznih sladkorjev (Berthels in sod., 2004). Metabolne aktivnosti kvasovk med fermentacijo nismo spremljali samo s sproščanjem CO₂ (Slika 5), temveč tudi s spremljanjem porabe sladkorjev in sinteze etanola. Čeprav so se celice v stacionarni fazi rasti prenehale deliti, so bile še vedno metabolno aktivne. Dokaz za to je bilo sproščanje CO₂, poraba fermentabilnih sladkorjev iz gojišč in tvorba etanola tudi še v pozni stacionarni fazi rasti (Fleet in Heard, 1992).

Ob primerjavi relativne porabe glukoze in fruktoze iz gojišč opazimo, da se je fruktoza porabljala hitreje kot glukoza (Slika 11), kar je obratno kot pri kvasovki *S. cerevisiae*, ki je hitreje porabljala glukozo (Prpar, 2006). Po naklonih krivulj (Slike 9–11) lahko sklepamo, da se je najhitreje porabljala fruktoza v gojišču z obema sladkorjema. Po končani 43-dnevni fermentaciji se je v gojišču, ki je vsebovalo začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l, le-te porabilo za 14,6 % več kot glukoze v gojišču, ki je vsebovalo čisto glukozo (Preglednica 2). Kvasovka *S. cerevisiae* pa je porabila samo za 8,2 % več glukoze iz gojišča s čisto glukozo kot fruktoze iz gojišča s čisto fruktozo (Prpar, 2006). Fruktoze v gojišču s čisto fruktozo se je porabilo za 13,6 % več kot v gojišču, ki je vsebovalo oba sladkorja. Največji odstotek vseh sladkorjev v CDM se je porabil v gojišču, ki je vsebovalo začetnih 400 g/l fruktoze (31,4 %), najmanjši pa v gojišču, ki je vsebovalo začetno koncentracijo glukoze 400 g/l (16,8 %). To se sklada z dejstvom, da je kvasovka *C. stellata* fruktofilna in da raje porablja fruktozo (Benda, 1988; Povhe Jemec, 2003; Berthels in sod., 2004).

S težavami upočasnenih in zaustavljenih alkoholnih fermentacij se ukvarja veliko raziskovalnih skupin. Eden izmed vzrokov za ta dva pojava je prenizko razmerje sladkorjev glukoze in fruktoze (GF) (Schütz in Gafner, 1993), kar je običajno posledica fermentacije mošta s čisto kulturo vinske kvasovke *S. cerevisiae*, ki je glukofilna kvasovka in v moštu raje porablja glukozo. Posledično se lahko razmerje GF zniža do te mere, da *S. cerevisiae* ni več sposobna vršiti fermentacije, kar upočasnjuje ali popolnoma zaustavi proces (Jolly in sod., 2006). Če bi torej v mošt dodali vcepek združenih kultur kvasovk *S. cerevisiae* in *C. stellata*, do tega pojava ne bi prišlo, ker bi slednja porabljala fruktozo in tako preprečila preveliko znižanje razmerja GF (Povhe Jemec, 2003; Jolly in sod., 2006). Tudi pri našem poskusu smo dokazali, da *C. stellata* raje porablja fruktozo in ne fermentira glukoze, če sta v gojišču prisotni obe heksozi (Slika 8). Tako kot pri kvasovki *S. cerevisiae* lahko tudi pri kvasovki *C. stellata* sklepamo, da so za prednostno porabo fruktoze v gojišču odgovorni transportni proteini in encimi, ki skrbijo za fosforilacijo sladkorjev v celici. Pri kvasovki *S. cerevisiae*, ki ima višjo afiniteto do glukoze, vsi transportni proteini razen encima HXK1, ki ima višjo afiniteto do fruktoze (Gancedo in Serrano, 1989; Berthels in sod., 2004), prednostno prenašajo glukozo. Verjetno za kvasovko *C. stellata* velja ravno obratno in imajo prenašalni proteini ter encimi za fosforilacijo heksoz višjo afiniteto do fruktoze.

Za učinkovito fermentacijo je potrebno dovolj asimilirajočega dušika. Ob hitri porabi dušika med fermentacijo pride posledično do inaktivacije transporta sladkorjev in zato do zmanjšanja učinkovitosti fermentacije proti koncu procesa (Salmon, 1989). Berthels in sodelavci (2004) so z dodajanjem vira dušika v drugem delu fermentacijskega procesa dokazali, da se po

dotatku dušika poraba fruktoze glede na porabo glukoze poveča. To naj bi bilo posledica preprečitve razgradnje heksoznih prenašalcev z višjo afiniteto za fruktozo. Vzrok za preferenčno porabo fruktoze so lahko tudi fizikalno-kemijske razlike med obema sladkorjema (Gancedo in Serrano, 1989; Berthels in sod., 2004) ali pa vpliv povišanih koncentracij etanola, ki se kopiči tekom fermentacije (Reed in Nagodawithana, 1988; Berthels in sod., 2004).

Sorazmerno s porabo sladkorjev so nastajali metabolni produkti, značilni za alkoholno fermentacijo s kvasovkami. Najpomembnejši med njimi je etanol (Slika 12, Priloga F3). Največ se ga je sintetiziralo v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l, kjer so bile kvasovke tudi najbolj metabolno aktivne (Slika 5). Količina proizvedenega etanola se je povečevala premosorazmerno s povečevanjem koncentracije fruktoze v gojišču. Pri fermentaciji CDM s kvasovko *S. cerevisiae* pa je sinteza etanola s povečevanjem koncentracije fruktoze v gojišču upadala (Prpar, 2006). Povišane koncentracije etanola pomenijo stres za mikroorganizme (Pina in sod., 2004). Zmanjšajo specifično hitrost rasti kvasovk, živost celic in specifično hitrost fermentacije (D'Amore in Stewart, 1987; Reed in Nagodawithana, 1988). Podoben učinek etanola smo opazili tudi pri našem poskusu, kjer so kvasovke, ki so sintetizirale največ etanola, imele najnižji odstotek živosti po 43 dneh fermentacije (Preglednica 1).

Eden izmed pomembnih končnih metabolitov enološke fermentacije je tudi glicerol. Za kvasovko *C. stellata* je značilno, da ga tvori v višjih koncentracijah, tudi od 10 do 14 g/l (Ciani in Picciotti, 1995; Ciani in Ferraro, 1996), medtem ko ga *S. cerevisiae* proizvede samo do približno 7 g/l (Ciani in Ferraro, 1996; Prpar, 2006). Med našim poskusom ga *C. stellata* ni sintetizirala v tako visokih koncentracijah (Slika 13, Priloga F4). Največ glicerola na 1 g porabljenih sladkorjev se je sintetiziralo v gojiščih z začetno koncentracijo glukoze 400 g/l (0,062 g) (Preglednica 3). To je za 50 % več, kot se ga je tvorilo pri podobnem poskusu s kvasovko *S. cerevisiae* (preračunano po Prpar, 2006). Kvasovke tvorijo glicerol kot odziv na osmotski stres (Nevoigt in Stahl, 1997) in kot odziv na neravnovesje redukcijskih ekvivalentov (Yalçın in Özbas, 2004). V našem primeru so ga verjetno tvorile kot prilagoditev na osmotski stres zaradi visokih začetnih koncentracij sladkorjev v gojiščih in kot prilagoditev na etanolni stres zaradi povečevanja vsebnosti etanola v gojiščih tekom fermentacije.

Za kvasovko *C. stellata* je značilno, da očetno kislino sintetizira v majhnih količinah (Ciani in Picciotti, 1995; Ciani in Ferraro, 1996). To je še ena lastnost *C. stellate*, ki nakazuje primernost uporabe v združenih kulturah za fermentacijo mošta s *S. cerevisiae*, ki proizvede precej več očetne kisline (Ciani in Ferraro, 1996). Tudi pri našem poskusu so bile koncentracije očetne kisline po 43 dneh fermentacije zelo nizke (Preglednica 4; Priloga F5).

Spreminjanje vrednosti pH gojišča med fermentacijo je posledica metabolne aktivnosti kvasovk. PH se je v vseh fermentorjih podobno spreminjal. Pri kvasovkah, ki so bile metabolno najbolj aktivne, se je pH gojišča najbolj znižal. Ko se je metabolna aktivnost kvasovk tekom fermentacije začela zniževati, so se vrednosti pH gojišč začele zviševati. Vrednosti pH gojišč so se pri fermentaciji s kvasovko *C. stellata* znižale bolj kot pri kvasovki *S. cerevisiae* (Prpar, 2006).

5.1.3 Hitrosti porabe sladkorjev in izkoristki

Največjo specifično hitrost porabe sladkorjev so dosegle kvasovke v gojišču, ki je vsebovalo glukozo in fruktozo (Preglednica 5). Specifične hitrosti sinteze etanola in CO₂ so sledile isti dinamiki. Tudi največjo maksimalno specifično hitrost rasti so dosegle kvasovke v gojišču z glukozo in fruktozo. Začetna koncentracija posameznega sladkorja vpliva na izkoristek substrata za tvorbo biomase (Preglednica 6). Največji izkoristek so dosegle kvasovke v gojišču s čisto glukozo. Izkoristki substrata za sintezo etanola so se skladali z metabolno aktivnostjo kvasovk in s produkcijo etanola v posameznem gojišču. Kvasovke, ki so rasle v gojišču s čisto fruktozo, so bile metabolno najbolj aktivne (Slika 5), proizvedle so najvišje koncentracije etanola (Slika 12) in imele največji izkoristek substrata za sintezo etanola.

5.2 PRIMERJAVA FERMENTACIJSKE UČINKOVITOSTI MUTIRANIH SEVOV *Candida stellata* ZIM 2287 IN *Candida stellata* ZIM 2290 S FERMENTACIJSKO UČINKOVITOSTJO STARŠEVskega SEVA *Candida stellata* ZIM 1842

Med poskusom smo testirali učinkovitost pretvorbe glukoze in fruktoze v etanol v gojišču CDM z enakima začetnima koncentracijama sladkorjev glukoze in fruktoze (200 g/l vsakega) z dvema sevoma kvasovke *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290. Oba seva sta bila pridobljena s postopkom mutagenoze in selekcije iz seva *C. stellata* ZIM 1842 in imata višjo toleranco na etanol kot starševski sev kvasovke.

Rezultate tega dela poskusa smo primerjali z rezultati, ki smo jih pridobili pri fermentaciji CDM z različnimi razmerji glukoze in fruktoze s starševskim sevom *C. stellata* ZIM 1842.

5.2.1 Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo in sproščanje CO₂

OD₆₅₀ se je povečevala skladno z rastjo kvasovk (Slika 15). Krivulje so imele značilno obliko rastne krivulje mikroorganizmov (Madigan in sod., 2003). Po približno 4. dnevu fermentacije so kvasovke vstopile v stacionarno fazo rasti. Metabolno najbolj aktivne so bile med 4. in 17. dnevom fermentacije, kar je razvidno iz količine proizvedenega CO₂ (Slika 16). Oba mutirana seva sta bila metabolno aktivnejša kot starševski sev *C. stellata* ZIM 1842.

Vsi trije sevi *C. stellata* so po 43 dneh fermentacije dosegli približno enako končno število vseh celic/ml gojišča (Preglednica 9). V našem poskusu so se celice namnožile do 10⁷ CFU/ml, kar je še vedno manj od predvidenega števila, ki ga navajata avtorja Fleet in Heard (1992). Največji odstotek živosti opazimo pri sevu *C. stellata* ZIM 2287, ki je za 24 % presegel sev *C. stellata* ZIM 2290 in kar za 58,9 % starševski sev *C. stellata* ZIM 1842.

5.2.2. Dinamika porabe sladkorjev in tvorbe metabolnih produktov v gojišču CDM med fermentacijo z različnimi sevi kvasovke *Candida stellata*

Glukoza se med fermentacijo ni porabljala (Slike 8 in 17 – 21). Seva kvasovke *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 sta ohranila fruktofilnost (Berthels in sod., 2004). Majhno spreminjanje koncentracije glukoze tekom fermentacije je bilo posledica napake pri meritvah. Sev *C. stellata* ZIM 2287 je fruktozo porabljal najhitreje (Sliki 20 in 21). Porabil je za dobre 3 % več fruktoze kot sev *C. stellata* ZIM 2290 in za skoraj 5 % več kot starševski sev *C. stellata* ZIM 1842.

Količina proizvedenega etanola v gojišču je bila odvisna od uporabljenega seva kvasovke *C. stellata*. Oba mutirana seva sta sintetizirala večje količine etanola kot starševski sev (Slika 22, Priloga F3), vendar še vedno za več kot polovico manj kot kvasovka *S. cerevisiae* (Prpar, 2006). Etanol zmanjša specifično hitrost rasti kvasovk, živost celic in specifično hitrost fermentacije (D'Amore in Stewart, 1987; Reed in Nagodawithana, 1988). Seva *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 sta s postopkom mutageneze postala odpornejša na etanol, saj je bil odstotek živosti kljub višjim končnim koncentracijam etanola v gojiščih po 43 dneh fermentacije precej višji kot pri starševskem sevu (Preglednica 9).

Sinteza glicerola je bila primerljiva pri vseh treh sevih kvasovke *C. stellata*, ki smo jih uporabili pri fermentaciji. Glede na podatke, ki jih zasledimo v literaturi (Ciani in Picciotti, 1995; Ciani in Ferraro, 1996), se je med našim poskusom sintetiziralo malo glicerola (Slika 23, Priloga F4).

Ocetno kislino je v zaznavnih koncentracijah sintetiziral samo starševski sev *C. stellata* ZIM 1842 (Preglednica 12; Priloga F5).

Vrednosti pH so se v gojiščih, kjer je potekala fermentacija s tremi različnimi sevi kvasovke *C. stellata*, podobno spreminjale (Slika 24). Tudi pri tem delu poskusa opazimo povezavo med metabolno aktivnostjo kvasovk (Slika 16) in spreminjanjem vrednosti pH gojišča.

5.2.3 Hitrosti porabe sladkorjev in izkoristki

Vsi trije sevi *C. stellata* so imeli različno specifično hitrost porabe sladkorja (Preglednica 13). Specifične hitrosti sinteze etanola, glicerola in CO₂ so sledile isti dinamiki. Najvišjo maksimalno specifično hitrost rasti je dosegel sev *C. stellata* ZIM 2290. Največji izkoristek substrata za tvorbo biomase so imele kvasovke *C. stellata* ZIM 2287 (Preglednica 14), ki so hkrati dosegle najvišje končno število celic/ml gojišča (Preglednica 9). Bile so tudi metabolno najbolj aktivne (Slika 16) in imele so največji izkoristek substrata za sintezo etanola.

5.3 SPECIFIČNA AKTIVNOST GLIKOLITIČNIH ENCIMOV

Glavna regulacija aktivnosti glikolitičnih encimov poteka z alosteričnimi efektorji (Gancedo in Serrano, 1989; Bagyan in sod., 2005). Eden izmed njih je tudi ATP, ki nastaja tekom glikolize in inhibitorno deluje na aktivnost fosfofruktokinaze (PFK) ter piruvat kinaze (PYK) (Gancedo in Serrano, 1989; Jurica in sod., 1998; Walker, 1998). ATP preko negativne povratne zanke skrbi, da aktivnost PFK ni previsoka in da je količina proizvedene energije na primernem nivoju (Bagyan in sod., 2005).

Pri našem poskusu smo specifično aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze (HXK), PFK in PYK določili po 14 dneh, ko je fermentacija potekala najbolj intenzivno in po 43 dneh, ko smo fermentacijo končali. Glede na metabolno aktivnost kvasovk, ki smo jo ovrednotili preko količine proizvedenega CO₂ (Slika 5), smo določili, da je najintenzivnejši del procesa potekal približno med 7 in 15 dnev fermentacije. Vzorčili smo po 14 dneh.

Vsi trije ključni glikolitični encimi (HXK, PFK, PYK) so bili po 14 dneh fermentacije aktivni samo pri kvasovkah, ki so rasle v gojišču z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l (Preglednica 7). Encima HXK in PFK po 14 dneh fermentacije nista bila aktivna pri kvasovkah, ki so rasle v gojišču s čisto glukozo ali v gojišču z obema sladkorjema. To je verjetno bila posledica napake pri meritvah, saj smo iz fermentorjev pridobili zelo malo mokre biomase. Encim PFK je imel pri vseh meritvah manjšo specifično aktivnost kot PYK (Preglednici 7 in 8), kar je lahko posledica delovanja alosteričnega inhibitorja ATP, ki nastaja v reakciji pretvorbe PEP v piruvat, ki jo katalizira PYK (Gancedo in Serrano, 1989). Encim PYK je bil po 14 dneh fermentacijskega procesa aktiven v vseh gojiščih, največjo specifično aktivnost pa je imel v gojišču, ki je vsebovalo čisto glukozo. Encim HXK, ki katalizira fosforilacijo sladkornih molekul po vstopu v kvasno celico (Berthels in sod., 2004), je dosegel po 43 dneh fermentacije v vseh gojiščih največje specifične aktivnosti (Preglednica 8).

Pri sevih kvasovke *C. stellata* ZIM 1842, *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 sta bila encima HXK in PYK po 43 dneh fermentacije aktivnejša kot po 14 dneh fermentacije (Preglednici 15 in 16). Encim PFK je bil po 14 in 43 dneh fermentacije približno enako aktiven. Nižja aktivnost encimov po 14 dneh fermentacije je lahko posledica visokih koncentracij celičnega ATP, ki inhibira delovanje encimov (Bagyan in sod., 2005). Koncentracije celičnega ATP so proti koncu fermentacije nižje zaradi zmanjšane metabolne aktivnosti kvasovk.

Kar nekaj časa so se za proizvodnjo vin uporabljale samo čiste kulture selekcioniranih kvasovk *S. cerevisiae*. Posledično se je zmanjšala kakovost vin. Ker jo hočejo ponovno izboljšati, zadnja leta uvajajo bio proizvodnjo vin in spet preizkušajo združene in mešane kulture kvasovk. Zaradi nekaterih svojih lastnosti je v tem pogledu zanimiva tudi kvasovka *C. stellata*. Potrebni so nadaljnji poskusi, ki bodo omogočili uporabo združenih in mešanih kultur kvasovk za fermentacijo mošta širokemu krogu vinarjev.

5.5 SKLEPI

- Kvasovka *Candida stellata* med fermentacijo raje porablja fruktozo kot glukozo.
- Z nižanjem razmerja glukoza/fruktoza oziroma z večanjem količine fruktoze v gojišču se tvori več etanola in CO₂.
- Odstotek celic, ki se lahko razmnožujejo in so sposobne tvoriti kolonije, je tem manjši, čim višja je koncentracija etanola.
- Vrednost pH gojišča se tekom alkoholne fermentacije spreminja v skladu z metabolno aktivnostjo kvasovk.
- Z mutagenezo in selekcijo pridobljena seva kvasovke *Candida stellata* ZIM 2287 in *Candida stellata* ZIM 2290 učinkoviteje pretvarjata glukozo in fruktozo v etanol in CO₂ kot starševski sev *Candida stellata* ZIM 1842.
- Specifična aktivnost piruvat kinaze je tekom fermentacije večja kot specifična aktivnost fosfofruktokinaze.
- Kvasovka *Candida stellata* je primerna za uporabo v združenih kulturah za fermentacijo mošta.

6 POVZETEK

Kvasovka *Candida stellata* je vrsta, ki jo skoraj vedno izoliramo s površine grozdja. Spada v skupino kvasovk, ki lahko pomembno vplivajo na potek spontane enološke fermentacije. Pri fermentaciji mošta v vino velikokrat prihaja do težav zaradi upočasnitve in predčasne zaustavitve procesa. Vzrok temu je lahko med drugim tudi prenizko razmerje glukoza/fruktoza v moštu. Fruktoza se lahko porablja počasneje ali hitreje od glukoze zaradi razlik v transportu in fosforilaciji obeh sladkorjev, zaradi fizikalno-kemijskih razlik med glukozo in fruktozo, zaradi razlik v zaznavanju obeh sladkorjev, v načinu vzdrževanja katabolne represije med alkoholno fermentacijo glukoze oziroma fruktoze, zaradi vpliva pomanjkanja hranil, inhibitornega delovanja višjih koncentracij etanola, osmotskega stresa zaradi povišanih koncentracij sladkorjev in lastnosti posameznega kvasnega seva.

Namen dela je bil ugotoviti vpliv kvasovke *C. stellata* na učinkovitost pretvorbe glukoze in fruktoze v etanol ter vpliv razmerja glukoza/fruktoza na alkoholno fermentacijo s to kvasovko. Za gojišče smo uporabili kemijsko definiran mošt, ki je vseboval različno začetno razmerje sladkorjev glukoze in fruktoze. Med fermentacijo smo spremljali porabo obeh sladkorjev in sintezo etanola, glicerola ter očetne kisline. Metabolno aktivnost kvasovk smo spremljali preko tvorbe CO₂. Vzorčili smo vsak 3. ali 4. dan. Vzorcem smo določili tudi vrednosti pH in OD₆₅₀. Med najbolj intenzivnim delom fermentacije in po končani 43-dnevni fermentaciji smo določili specifične aktivnosti treh ključnih glikolitičnih encimov. V primerjavi s starševskim sevom smo testirali še fermentacijsko učinkovitost dveh z mutagenezo in selekcijo pridobljenih sevov kvasovke *C. stellata*. V ta namen smo uporabili kemijsko definiran mošt z enakim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza.

Ugotovili smo, da kvasovka *C. stellata* prednostno porablja fruktozo. Manjše kot je bilo razmerje glukoza/fruktoza, več etanola se je sintetiziralo in bolj so bile kvasovke metabolno aktivne. Kvasovke, ki so rasle v gojišču s čisto fruktozo, so proizvedle skoraj za dve tretjini več etanola kot kvasovke, ki so rasle v gojišču s čisto glukozo. Odstotek celic s sposobnostjo razmnoževanja in tvorbe kolonij je bil tem manjši, čim višja je bila koncentracija etanola. Z mutagenezo in selekcijo pridobljena seva *C. stellata* ZIM 2287 in *C. stellata* ZIM 2290 sta učinkoviteje pretvarjala glukozo in fruktozo v etanol in CO₂ kot starševski sev *C. stellata* ZIM 1842. Za natančnejše poznavanje vzrokov za prednostno porabo fruktoze pri *C. stellata* bi bile potrebne nadaljnje raziskave metabolizma in delovanja glikolitičnih encimov.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 195 str.
- André L., Henning A., Adler L. 1991. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*: studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). FEBS Letters, 286, 1, 2: 13-17.
- Bagyan S., Mair T., Dulos E., Boissonade J., De Kepper P., Müller S.C. 2005. Glycolytic oscillations and waves in an open spatial reactor: Impact of feedback regulation of phosphofruktokinase. Biophysical Chemistry, 116: 67–76.
- Bardi L., Cocito C., Marzona M. 1999. *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. International Journal of Food Microbiology, 47: 133-140.
- Batič M., Bayer K.A. 1996. Merjenje bioloških parametrov v bioreaktorjih. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 689-710.
- Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 286 str.
- Bavec A., Stojan J., Zorko M. 2000. Navodila za laboratorijske vaje iz biokemije. Ljubljana, Scripta: 70 str.
- Bely M., Rinaldi A., Dubourdieu D. 2003. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering, 96, 6: 507-512.
- Benda I. 1988. Untersuchungen zur Frage der Fruktophilie und Osmotoleranz bei der Hefeart *Candida stellata* (syn. *Torulopsis stellata*). Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruechteverwertung, 38: 60-65.
- Berthels N.J., Cordero Otero R.R., Bauer F.F., Thevelein J.M., Pretorius I.S. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. FEMS Yeast Research, 4: 683-689.
- Bisson L.F. 1992. Yeasts – Metabolism of sugars. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H.(ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 55-75.
- Bisson L.F. 1999. Stuck and sluggish fermentations (Review). American Journal of Enology and Viticulture, 50, 1: 107-119.

- Boze H., Moulin G., Galzy P. 1995. Production of microbial biomass. V: Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise. Vol. 9: Enzymes, biomass, food and feed. 2nd ed. Reed G., Nagodawithana T.W. (eds.). Weinheim, Verlag Chemie: 167-220.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cabrera M.J., Moreno J., Ortega J.M. Medina M. 1988. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximénez grapes in various degrees of ripeness. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 4: 283-287.
- Carrau F.M., Neirotti E., Gioia O. 1993. Stuck wine fermentations: effect of killer/sensitive yeast interactions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76, 1: 67-69.
- Cartwright P.C., Rose A.H., Calderbank J., Keenan M.H. 1989. Solute transport. V: The yeasts. Vol. 3: Metabolism and physiology of yeasts. 2nd ed. Rose A.H., Harrison J.S. (eds.). London, Academic Press: 5-56.
- Charoenchai C., Fleet G.H., Henschke P.A. 1998. Effects of temperature, pH, and sugar concentration on the growth rates and cell biomass of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 3: 283-288.
- Ciani M., Picciotti G. 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *Biotechnology Letters*, 17, 11: 1247-1250.
- Ciani M., Ferraro L. 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1: 128-132.
- Ciani M., Ferraro L. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 247-254.
- Ciani M., Beco L., Comitini F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 239-245.
- Ciani M., Comitini F. 2006. Influence of temperature and oxygen concentration on the fermentation behaviour of *Candida stellata* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22: 619-623.

- Clemente-Jimenez J.M., Mingorance-Cazorla L., Sergio Martínez-Rodríguez S., Heras-Vázquez F.J., Rodríguez-Vico F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21: 149–155.
- Combina M., Elía A., Mercado L., Catania C., Ganga A., Martinez C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 237–243.
- Constanti M., Poblet M., Arola L., Mas A., Guillamon J.M. 1997. Analysis of yeast population during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 3: 339-344.
- Cortassa S., Aon M.A. 1997. Distributed control of the glycolytic flux in wild-type cells and catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae* growing in carbon-limited chemostat cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 596-602.
- D'Amore T., Stewart G.G. 1987. Ethanol tolerance of yeast (Review). *Enzyme and Microbial Technology*, 9: 322-330.
- de Jong – Gubbels P., Vanrolleghem P., Heijnen S., van Dijken J.P., Pronk J.T. 1995. Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixtures of glucose and ethanol. *Yeast*, 11: 407-418.
- Dequin S., Salmon J.M., Nguyen H.V., Blondin B. 2003. Wine yeasts. V: Yeasts in food. Boekhout T., Robert V. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing: 389-412.
- Dittrich H.H. 1995. Wine and brandy. V: Biotechnology: a multi-volume comprehensive treatise: Vol. 9: Enzymes, biomass, food and feed. 2nd ed. Reed G., Nagodawithana T.W. (eds.). Weinheim, Verlag Chemie: 463-504.
- Domizio P., Lencioni L., Ciani M., Di Blasi S., Pontremolesi C., Sabatelli M.P. 2007. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 115: 281–289.
- Drysdale G.S., Fleet G.H. 1989. The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 67: 471-481.
- Edwards C.G., Beelman R.B., Bartley C.E., McConnell A.L. 1990. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 1: 48-56.

- Erasmus D.J., van der Merwe G.K., van Vuuren H.J.J. 2003. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, 3: 375-399.
- Espinel A.E., Gomez-Toribio V., Peinado J.M. 1996. The inactivation of hexokinase activity does not prevent glucose repression in *Candida utilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 135: 327-332.
- Ferraro L., Fatichenti F., Ciani M. 2000. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 35: 1125-1129.
- Fleet G.H., Heard G.M. 1992. Yeasts – Growth during fermentation. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H.(ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 27-54.
- Fleet G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour (Review). *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11 – 22.
- Gafner J., Schütz M. 1996. Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experiences to restart stuck fermentations. *Wein-Wissenschaft Viticultural and Enological Sciences*, 51, 3: 214-218.
- Gancedo C., Serrano R. 1989. Energy-yielding metabolism. V: The yeasts. Vol. 3: Metabolism and physiology of yeasts. 2nd ed. Rose A.H., Harrison J.S. (eds.). London, Academic Press: 205-259.
- Gao C., Fleet G.H. 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 405-409.
- Gonçalves P., Planta R.J. 1998. Starting up yeast glycolysis (Review). *Trends in Microbiology*, 6, 8: 314-319.
- Heard G.M., Fleet G.H. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 3: 727-728.
- Heard G.M., Fleet G.H. 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 23-28.
- Heijnen J.J. 2006. Stoichiometry and kinetics of microbial growth from a thermodynamic perspective. V: Basic biotechnology. 3rd ed. Ratledge C., Kristiansen B. (eds.). Cambridge, University Press: 55-71.

- Henschke P.A., Jiranek V. 1992. Yeasts – Metabolism of nitrogen compounds. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 77-164.
- Hohmann S. 1997. The response of yeasts to osmotic stress. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). Heidelberg, Springer-Verlag: 101-145.
- Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 17, 6: 316-323.
- Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production (Review). South African Journal of Enology and Viticulture, 27, 1: 15-39.
- Jurica M.S., Mesecar A., Heath P.J., Shi W., Nowak T., Stoddard B.L. 1998. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. Structure, 6, 2: 195-210.
- Kastelec B. 2001. Spremljanje populacije kvasovk med fermentacijo mošta kraljevine. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 65 str.
- Klenar I. 2002. Ali lahko starterske kulture kvasovk pripomorejo h kakovostni fermentaciji? V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije v proizvodnji vina. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Univerza v Ljubljani: 21-30.
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 250 str.
- Kunkee R.E., Bisson L.F. 1993. Wine-making yeasts. V: The yeasts: Vol. 5: Yeast technology. 2nd ed. Rose A.H., Harrison J.S. (eds.). London, Academic Press: 69-127.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. 1998. The yeasts, A taxonomic study. 4th ed. Kurtzman C.P., Fell J.W. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science Publishers: 1055 str.
- Kurtzman C.P., Boekhout T., Robert V., Fell J.W., Deak T. 2003. Methods to identify yeasts. V: Yeasts in food. Boekhout T., Robert V. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing: 69-121.
- Lafon-Lafourcade S., Geneix C., Ribéreau-Gayon P. 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. Applied and Environmental Microbiology, 47, 6: 1246-1249.
- Lauzi G. 1996. Wein. Kennen und geniessen. Köln, Buch und Zeit Verlagsgesellschaft: 160 str.

- Luparia V., Soubeyrand V., Berges T., Julien A., Salmon J.M. 2004. Assimilation of grape phytosterols by *Saccharomyces cerevisiae* and their impact on enological fermentations. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 65: 25-32.
- Madigan T.M., Martinko M.J., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. New Jersey, Pearson Education, Inc.: 1078 str.
- Martínez de Marañón I., Tourdot-Marechal R., Gervais P. 2001. Involvement of osmotic cell shrinkage on the proton extrusion rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 241–246.
- Mateo J.J., Jimenez M., Huerta T., Pastor A. 1991. Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology*, 14: 153-160.
- Mavc N. 2000. Raznolikost kvasovk med fermentacijo mošta modre frankinje. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 63 str.
- Mora J., Barbas J.I., Ramis B., Mulet A. 1988. Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 4: 344-346.
- Mora J., Mulet A. 1991. Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 2: 133-136.
- Moreno F., Herrero P. 2002. The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae* (Review). *FEMS Microbiology Reviews*: 26: 83-90.
- Munoz E., Ingledew W.M. 1989. Effect of yeast hulls on stuck and sluggish wine fermentations: importance of the lipid component. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 6: 1560-1564.
- Nelson D.L., Cox M.M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. 3rd ed. New York, Worth Publishers: 1152 str.
- Nemanič J. 1996. Spoznajmo vino: vina in sorte, degustacija in ocenjevanje, vino in hrana. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 178 str.
- Nevoigt E., Stahl U. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Review). *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 231-241.
- Özilgen M., Çelik M., Bozoğlu T.F. 1991. Kinetics of spontaneous wine production. *Enzyme Microbiology and Technology*, 13: 252-256.

- Pardo I., Garcia M.H., Zuniga M., Uruburu F. 1989. Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2: 539-541.
- Paš M., Milačič R., Drašlar K., Pollak N., Raspor P. 2004. Uptake of chromium(III) and chromium(VI) compounds in the yeast cell structure. *Biometals*, 17: 25-33.
- Pina C., Santos C., Couto J.A., Hogg T. 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions. *Food Microbiology*, 21: 439-447.
- Povhe Jemec K., Čadež N., Zagorc T., Bubič V., Župec A., Raspor P. 2001. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiology*, 18: 247-259.
- Povhe Jemec K. 2003. Mikrobna združba kvasovk v moštu Malvazije in njen vpliv na potek alkoholne fermentacije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 134 str.
- Pretorius I.S. 2002. Vinske kvasovke za tretje tisočletje: sodobni pristopi k starodavni umetnosti vinarstva. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije v proizvodnji vina. Raspor P. (ur.). Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Univerza v Ljubljani: 2-12.
- Prpar S. 2006. Vpliv razmerja glukoza/fruktoza na potek alkoholne fermentacije s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 65 str.
- Querol A., Fernández-Espinar M.T., del Olmo M., Barrio E. 2003. Adaptive evolution of wine yeast (Review). *International Journal of Food Microbiology*, 86: 3-10.
- Raspor P., Čuš F., Povhe Jemec K., Zagorc T., Čadež N., Nemanič J. 2002. Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must. *Food Technology and Biotechnology*, 40, 2: 95-102.
- Raspor P., Miklič Milek D., Polanc J., Smole Možina S., Čadež N. 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 97-102.
- Ratledge C. 2006. Biochemistry and physiology of growth and metabolism. V: Basic biotechnology. 3rd ed. Ratledge C., Kristiansen B. (eds.). Cambridge, University Press: 25-54.
- Reed G., Nagodawithana T.W. 1988. Technology of yeast usage in winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 1: 83-90.

- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. 2000a. Handbook of enology: Vol. 1: The microbiology of wine and vinifications. Chichester, John Wiley & Sons: 454 str.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2000b. Handbook of enology: Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. Chichester, John Wiley & Sons: 404 str.
- Robinson J. 1999. The Oxford companion to wine. 2nd ed. Oxford, Oxford University Press: 820 str.
- Rojas V., Gil J.V., Piñaga F., Manzanares P. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 181–188.
- Rolland F., Winderickx J., Thevelein J.M. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells (Review). *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 5: 310-317.
- Romano P., Suzzi G., Domizio P., Faticenti F. 1997. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71: 239-242.
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 169-180.
- Rosini G. 1984. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *Journal of General and Applied Microbiology*, 30: 249-256.
- Salmon J.M. 1989. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 4: 953-958.
- Schütz M., Gafner J. 1993. Sluggish alcoholic fermentation in relation to alterations of the glucose-fructose ratio. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*, 15: 73-78.
- Schütz M., Gafner J. 1995. Lower fructose uptake capacity of genetically characterized strains of *Saccharomyces bayanus* compared to strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a likely cause of reduced alcoholic fermentation activity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 2: 175-180.
- Sharf R., Margalith P. 1983. The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17: 311-313.

- Skaza A. 1988. Kletarjenje je užitek. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 160 str.
- Soden A., Francis I.L., Oakey H., Henschke P.A. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6: 21-30.
- Swan T.M., Watson K. 1998. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiology Letters*, 169: 191-197.
- Šikovec S. 1996. Vino, pijača doživetja. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 321 str.
- Taber R.L., Campbell A., Spencer S. 1998. A simple experiment demonstrating the allosteric regulation of yeast pyruvate kinase. *Biochemical Education*, 26: 73-76.
- Tamás M.J., Rep M., Thevelein J.M., Hohmann S. 2000. Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Letters*, 472: 159-165.
- Tóth-Markus M., Magyar I., Kardos K., Bánszky L., Maráz A. 2002. Study of Tokaji Aszú wine flavour by solid phase microextraction method. *Acta Alimentaria*, 31, 4: 343-354.
- Urtubia A., Pérez-Correa J.R., Soto A., Pszczółkowski P. 2007. Using data mining techniques to predict industrial wine problem fermentations. *Food Control*, 18: 1512-1517.
- van Hoek P., van Dijken J.P., Pronk J.T. 2000. Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 724-736.
- Walker G.M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester, John Wiley & Sons: 350 str.
- Yalçın S.K., Özbas Z.Y. 2004. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. *Process Biochemistry*, 39: 1285–1291.
- Župec A. 1998. Vrstna sestava populacije kvasovk v moštu malvazije. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 78 str.

ZAHVALA

Prof. dr. Petru Rasporju se zahvaljujem za mentorstvo pri diplomski nalogi, za pomoč in strokovno vodenje.

Janji Klinčar se zahvaljujem za pomoč pri opravljanju eksperimentalnega dela diplome in za pomoč ter nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Prof. dr. Nini Gunde-Cimerman se zahvaljujem za recenzijo diplomske naloge.

Hvala tudi vsem na Katedri za biotehnologijo za pomoč in prijetno vzdušje v laboratoriju.

Hvala tudi vsem mojim domačim za potrpežljivost in vzpodbudo tekom študija, predvsem pa mami, ki mi je študij omogočila.

Hvala Katji, Ivi, Mariji, Tini, Mariji, Petri, Renati, Vesni in vsem ostalim za prijateljstvo, vzpodbudo in dobre živce, ko sem vam »težila«.

Hvala za pomoč pri končnem oblikovanju diplomske naloge tudi Ani in Filipu.

Hvala, ker niste obupali nad mano. Super ste!

PRILOGE

PRILOGA A: Sestava kemijsko definirane mošta (CDM) (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992).

Kemikalija	Proizvajalec	Masa (g/l)
Glukoza	Kemika	400; 200 oz. 0
Fruktoza	Merck	400; 200 oz. 0
K-tartrat	Merck	5
L-jabolčna kislina	/	3
Citronska kislina	Sigma	0,2
K ₂ HPO ₄	Merck	1,14
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Sigma	1,23
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck	0,44
MnCl ₂ x 4H ₂ O	Merck	0,0001982
ZnCl ₂	Fluka	0,0001355
FeCl ₂	Merck	0,0000320
CuCl ₂ x 2H ₂ O	Aldrich	0,0000136
borna kislina	Merck	0,0000057
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	Sigma	0,0000291
Na-molibdat x 2H ₂ O	Kemika	0,0000242
KJO ₃	/	0,0000108
Mio-inositol	Sigma	0,1
piridoksin x HCl	Aldrich	0,002
nikotinska kislina	/	0,002
Ca-pantotenat	Fluka	0,001
tiamin x HCl	Aldrich	0,0005
P-amino benzojeva kislina	/	0,0002
riboflavin	Sigma	0,0002
biotin	Fluka	0,000125
folna kislina	Sigma	0,0002
alanin	Merck	0,1
arginin	Aldrich	0,75
asparagin	Sigma	0,15
aspartinska kislina	Sigma	0,35
glutaminska kislina	Sigma	0,5
glutamin	Merck	0,2
glicin	Sigma	0,05
histidin	Sigma	0,15
izolevcin	Merck	0,2
levcin	Sigma	0,3
lizin	Sigma	0,25
metionin	Sigma	0,15
fenilalanin	Sigma	0,15
prolin	Sigma	0,5
serin	Sigma	0,4
treonin	Sigma	0,35
triptofan	Sigma	0,1
tirozin	Aldrich	0,02
valin	Sigma	0,2

Minerale, vitamine in aminokislino smo pripravili v založnih raztopinah (priloga A1, A2 in A3), ostale kemikalije pa smo ob pripravi gojišča zatehtali v infuzijske steklenice.

PRILOGA A1: Protokol za pripravo založnih raztopin mineralov.

Kemikalija	Priprava	Koncentracija založne raztopine (g/l)
MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,1982 g v 100 ml destilirane vode	1,982
ZnCl ₂	0,1355 g v 100 ml destilirane vode	1,355
FeCl ₂	0,0320 g v 100 ml destilirane vode	0,320
CuCl ₂ x 2H ₂ O	0,0136 g v 100 ml destilirane vode	0,136
borna kislina	0,0057 g v 100 ml destilirane vode	0,057
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	0,0291 g v 100 ml destilirane vode	0,291
Na-molibdat x 2H ₂ O	0,0242 g v 100 ml destilirane vode	0,242
KJO ₃	0,0108 g v 100 ml destilirane vode	0,108

Opomba: Založne raztopine mineralov smo pripravili posamezno. V 1 l CDM smo dodali 100 µl založne raztopine posameznega minerala.

PRILOGA A2: Protokol za pripravo založne raztopine vitaminov.

Kemikalija	Priprava	Koncentracija založne raztopine (g/l)
Mio-inositol	10 g v 100 ml destilirane vode	100
piridoksin x HCl	0,2 g v 100 ml destilirane vode	2
nikotinska kislina	0,2 g v 100 ml destilirane vode	2
Ca-pantotenat	0,1 g v 100 ml destilirane vode	1
tiamin x HCl	0,05 g v 100 ml destilirane vode	0,5
P-amino benzojeva kislina	0,02 g v 100 ml destilirane vode	0,2
riboflavin	0,02 g v 100 ml destilirane vode	0,2
biotin	0,0125 g v 100 ml destilirane vode	0,125
folna kislina	0,02 g v 100 ml destilirane vode	0,2

Opomba: Založno raztopino vitaminov smo pripravili skupaj v eni raztopini. V 1 l CDM smo dodali 1 ml založne raztopine vitaminov.

PRILOGA A3: Protokol za pripravo založne raztopine aminokislin.

Aminokislina	Priprava	Koncentracija založne raztopine (g/l)
alanin	1,6 g v 1l destilirane vode	1,6
arginin	12 g v 1l destilirane vode	12
asparagin	2,4 g v 1l destilirane vode	2,4
aspartinska kislina	5,6 g v 1l destilirane vode	5,6
glutaminska kislina	8 g v 1l destilirane vode	8
glutamin	3,2 g v 1l destilirane vode	3,2
glicin	0,8 g v 1l destilirane vode	0,8
histidin	2,4 g v 1l destilirane vode	2,4
izolevcin	3,2 g v 1l destilirane vode	3,2
levcin	4,8 g v 1l destilirane vode	4,8
lizin	4 g v 1l destilirane vode	4
metionin	2,4 g v 1l destilirane vode	2,4
fenilalanin	2,4 g v 1l destilirane vode	2,4
prolin	8 g v 1l destilirane vode	8
serin	6,4 g v 1l destilirane vode	6,4
treonin	5,6 g v 1l destilirane vode	5,6
triptofan	1,6 g v 1l destilirane vode	1,6
tirozin	0,32 g v 1l destilirane vode	0,32
valin	3,2 g v 1l destilirane vode	3,2

Opomba: Založno raztopino aminokislin smo pripravili skupaj v eni raztopini. V 1 l CDM smo dodali 62,5 ml založne raztopine aminokislin.

PRILOGA B: Razmerja glukoze in fruktoze ter sevi kvasovke *Candida stellata* v posameznem CDM (osenčeno).

		Glukoza (g/l)				
		0	200	200	200	400
Fruktoza (g/l)	400	ZIM 1842				
	200		ZIM 1842			
	200			ZIM 2287		
	200				ZIM 2290	
	0					ZIM 1842

Opomba: gojišča smo pripravili v treh ponovitvah. To pomeni, da smo imeli 15 fermentorjev.

PRILOGA D: Zadrževalni časi glukoze, fruktoze in zunajceličnih metabolitov (glicerol, etanol, očetna kislina) na koloni Aminex (BioRad).

Spojina	Zadrževalni čas (min)	Detektor
glukoza	8,28	RI
fruktoza	8,99	RI
glicerol	12,26	RI
etanol	20,41	RI
očetna kislina	13,93	UV/VIS

PRILOGA E1: Podatki za rastno krivuljo kvasovke *C. stellata* ZIM 1842, ki smo jo gojili v gojišču CDM s koncentracijo sladkorjev 20 g/l (10 g/l glukoze + 10 g/l fruktoze) (aerobna submerzna kultivacija na stresalniku, 25 ur, 200 vrt./min, 28 °C).

Čas (ure)	OD₆₅₀					
	A	B	C	Povprečje	SD	KV (%)
0	0,233	0,190	0,191	0,205	0,02	11,96
2,3	0,303	0,244	0,203	0,250	0,05	20,16
4,3	0,458	0,414	0,353	0,408	0,05	12,81
6,3	0,755	0,678	0,536	0,657	0,11	16,91
8,3	1,117	1,108	0,803	1,009	0,18	17,70
10,3	1,435	1,335	1,169	1,313	0,13	10,25
12,3	1,647	1,577	1,460	1,561	0,09	6,05
24,3	1,756	1,759	1,767	1,760	0,01	0,32

PRILOGA E2: Podatki za rastno krivuljo kvasovke *C. stellata* ZIM 1842, ki smo jo gojili v gojišču CDM s koncentracijo sladkorjev 400 g/l (200 g/l glukoze + 200 g/l fruktoze) (aerobna submerzna kultivacija na stresalniku, 25 ur, 200 vrt./min, 28 °C).

Čas (ure)	OD₆₅₀					
	A	B	C	Povprečje	SD	KV (%)
0	0,204	0,193	0,223	0,207	0,02	7,41
2,7	0,213	0,201	0,240	0,218	0,02	9,25
4,7	0,326	0,311	0,346	0,328	0,02	5,41
6,7	0,482	0,493	0,562	0,512	0,04	8,47
8,7	0,719	0,734	0,807	0,753	0,05	6,25
10,7	0,969	0,996	1,107	1,024	0,07	7,15
12,7	1,223	1,253	1,326	1,267	0,05	4,17
24,7	1,847	1,803	1,856	1,835	0,03	1,56

PRILOGA F1: Poraba glukoze (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev in konc. glc/fru (g/l)	Potek fermentacije (dan)							
	0		4		7		11	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	393,99±10,90	2,77	374,93±17,09	4,56	384,75±2,46	0,64	380,28±12,81	3,37
ZIM 1842; 200/200	197,26±6,82	3,46	191,38±1,87	0,98	199,23±11,08	5,56	200,70±2,83	1,41
ZIM 2287; 200/200	199,40±23,34	11,71	186,45±7,56	4,05	199,34±8,24	4,13	190,28±5,87	3,09
ZIM 2290; 200/200	201,36±10,81	5,37	192,62±3,84	1,99	197,54±11,59	5,87	198,44±2,97	1,49
	14		18		21		25	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	390,86±14,25	3,64	364,10±38,62	10,61	359,83±5,92	1,64	355,43±8,49	2,39
ZIM 1842; 200/200	200,37±5,33	2,66	199,94±1,82	0,91	196,25±2,66	1,36	198,57±0,80	0,40
ZIM 2287; 200/200	191,09±4,56	2,38	198,69±2,90	1,46	200,37±1,09	0,54	196,73±2,68	1,36
ZIM 2290; 200/200	197,54±3,55	1,80	202,04±3,57	1,77	203,89±4,87	2,39	193,79±3,30	1,70
	28		32		36		40	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	341,14±6,66	1,95	347,46±8,78	2,53	334,48±4,35	1,30	327,84±5,79	1,76
ZIM 1842; 200/200	195,05±1,43	0,73	198,19±1,24	0,63	201,33±3,24	1,61	196,99±1,87	0,95
ZIM 2287; 200/200	193,42±9,00	4,65	196,48±1,68	0,85	191,96±4,62	2,41	191,32±1,80	0,94
ZIM 2290; 200/200	198,96±12,96	6,52	193,93±3,42	1,76	195,11±4,27	2,19	196,19±3,79	1,93
	43							
	Povpr.±SD	KV (%)						
ZIM 1842; 400/0	327,76±5,03	1,54						
ZIM 1842; 200/200	196,70±3,13	1,59						
ZIM 2287; 200/200	193,50±2,72	1,41						
ZIM 2290; 200/200	195,10±4,67	2,40						

PRILOGA F2: Poraba fruktoze (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev in konc. glc/fru (g/l)	Potek fermentacije (dan)							
	0		4		7		11	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 0/400	380,50±2,38	0,01	327,11±3,98	1,22	341,16±10,23	3,00	331,75±4,77	1,44
ZIM 1842; 200/200	188,00±6,75	3,59	171,55±1,73	1,01	172,46±10,61	6,15	163,75±3,13	1,91
ZIM 2287; 200/200	188,73±21,16	11,21	164,17±3,89	2,37	167,27±8,15	4,87	148,32±7,70	5,19
ZIM 2290; 200/200	191,52±7,66	4,00	173,04±4,14	2,40	170,09±11,56	6,80	161,37±3,37	2,09
	14		18		21		25	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 0/400	335,85±10,12	3,01	318,46±6,74	2,12	306,99±11,19	3,65	301,94±5,86	1,94
ZIM 1842; 200/200	157,86±5,14	3,26	150,23±3,08	2,05	142,40±0,63	0,45	138,23±2,81	2,04
ZIM 2287; 200/200	142,73±3,48	2,44	140,11±4,63	3,30	135,58±2,29	1,69	126,11±3,39	2,69
ZIM 2290; 200/200	155,36±2,89	1,86	152,00±2,71	1,78	144,48±5,12	3,54	134,34±4,47	3,33
	28		32		36		40	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 0/400	298,67±12,06	4,04	286,91±3,95	1,38	270,42±12,71	4,70	259,41±5,86	2,26
ZIM 1842; 200/200	131,89±3,97	3,01	129,04±4,23	3,28	129,19±5,80	4,49	122,72±4,82	3,92
ZIM 2287; 200/200	118,01±6,58	5,58	114,17±2,79	2,44	108,64±3,38	3,11	103,86±2,23	2,15
ZIM 2290; 200/200	129,70±3,89	3,00	124,06±3,61	2,91	122,44±3,83	3,13	118,82±3,18	2,68
	43							
	Povpr.±SD	KV (%)						
ZIM 1842; 0/400	261,03±4,12	1,58						
ZIM 1842; 200/200	119,32±3,95	3,31						
ZIM 2287; 200/200	101,07±1,28	1,26						
ZIM 2290; 200/200	114,77±3,63	3,17						

PRILOGA F3: Sinteza etanola (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev in konc. glc/fru (g/l)	Potek fermentacije (dan)							
	7		11		14		18	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	0	0	0	0	9,89±0,53	3,50	12,75±0,56	4,40
ZIM 1842; 0/400	0	0	20,61±0,00	0	26,28±0,70	2,67	32,29±0,30	0,92
ZIM 1842; 200/200	0	0	10,02±0,00	0	14,53±0,23	1,57	17,68±0,86	4,87
ZIM 2287; 200/200	9,50±0,00	0	14,50±0,00	0	17,69±0,76	4,32	22,35±0,44	1,97
ZIM 2290; 200/200	0	0	10,89±0,00	0	14,66±1,37	9,37	19,23±1,02	5,28
	21		25		28		32	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	13,79±0,78	5,68	17,91±1,92	10,71	16,92±1,02	6,02	19,03±0,19	0,99
ZIM 1842; 0/400	36,06±1,52	4,22	41,53±1,78	4,30	43,93±2,46	5,61	47,99±3,17	6,61
ZIM 1842; 200/200	19,34±2,47	12,75	22,93±1,32	5,77	23,82±1,30	5,47	26,15±1,30	4,96
ZIM 2287; 200/200	24,81±0,43	1,75	28,84±0,31	1,08	29,66±0,78	2,64	33,24±0,86	2,17
ZIM 2290; 200/200	21,36±0,87	4,05	23,80±0,84	3,53	25,18±1,19	4,72	27,73±0,98	3,53
	36		40		43			
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)		
ZIM 1842; 400/0	20,85±0,92	4,39	22,40±1,20	5,34	22,83±0,82	3,57		
ZIM 1842; 0/400	51,12±2,17	4,24	53,19±1,26	2,37	58,02±2,26	3,90		
ZIM 1842; 200/200	29,36±1,05	3,59	31,17±1,64	5,27	32,32±1,78	5,52		
ZIM 2287; 200/200	35,51±1,14	3,21	38,47±0,13	0,33	41,05±0,99	2,42		
ZIM 2290; 200/200	30,84±1,00	3,24	33,03±0,78	2,36	36,08±1,62	4,48		

PRILOGA F4: Sinteza glicerola (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev in konc. glc/fru (g/l)	Potek fermentacije (dan)							
	14		18		21		25	
	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	2,08±0,03	1,35	2,52±0,12	4,70	2,86±0,14	4,72	3,25±0,13	4,05
ZIM 1842; 0/400	1,61±0,09	5,81	1,95±0,00	0	1,99±0,13	6,29	2,40±0,24	10,07
ZIM 1842; 200/200	1,32±0,00	0,00	1,67±0,07	4,06	1,92±0,11	5,81	2,04±0,09	4,56
ZIM 2287; 200/200	1,72±0,08	4,44	2,10±0,03	1,49	2,42±0,07	2,79	2,60±0,09	3,51
ZIM 2290; 200/200	1,38±0,07	4,88	1,76±0,05	2,91	1,90±0,13	6,58	2,13±0,09	4,37
	28		32		36		40	
Sev in konc. glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	3,28±0,07	2,05	3,74±0,12	3,28	3,59±0,11	2,93	3,69±0,03	0,76
ZIM 1842; 0/400	2,51±0,20	8,04	2,71±0,21	7,66	3,34±0,59	17,53	2,80±0,13	4,81
ZIM 1842; 200/200	2,23±0,09	4,20	2,45±0,12	4,90	2,42±0,06	2,53	2,48±0,06	2,46
ZIM 2287; 200/200	2,64±0,18	6,67	2,96±0,03	0,86	2,95±0,09	3,02	3,27±0,33	10,13
ZIM 2290; 200/200	2,25±0,16	7,34	2,44±0,03	1,04	2,47±0,05	1,96	2,67±0,06	2,14
	43							
Sev in konc. glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)						
ZIM 1842; 400/0	4,09±0,05	1,30						
ZIM 1842; 0/400	3,15±0,14	4,38						
ZIM 1842; 200/200	2,79±0,09	3,28						
ZIM 2287; 200/200	3,52±0,08	2,28						
ZIM 2290; 200/200	2,95±0,04	1,26						

PRILOGA F5: Sinteza oetne kisline (g/l) med fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so povprečne vrednosti, standardni odkloni (SD) in koeficienti variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev in konc. glc/fru (g/l)	Potek fermentacije (dan)	
	43	
	Povpr.±SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	0,02±0,001	2,28
ZIM 1842; 0/400	0,02±0,003	15,68
ZIM 1842; 200/200	0,01±0,008	79,93
ZIM 2287; 200/200	0	0
ZIM 2290; 200/200	0	0

PRILOGA G1: Relativna poraba glukoze pri fermentaciji gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev in konc. glc (g/l)	Potek fermentacije (dan)							
	4		7		11		14	
	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)
ZIM 1842; 400	19,06	4,84	9,24	2,35	13,71	3,48	3,14	0,80
ZIM 1842; 200	5,88	2,98	-1,96	-1,00	-3,43	-1,74	-3,11	-1,58
ZIM 2287; 200	12,95	6,49	0,05	0,03	9,11	4,57	8,31	4,17
ZIM 2290; 200	8,74	4,34	3,82	1,90	2,92	1,45	3,82	1,90
	18		21		25		28	
	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)
ZIM 1842; 400	29,89	7,59	34,16	8,67	38,56	9,79	52,85	13,41
ZIM 1842; 200	-2,67	-1,35	1,01	0,51	-1,31	-0,66	2,22	1,12
ZIM 2287; 200	0,71	0,36	-0,98	-0,49	2,67	1,34	5,97	3,00
ZIM 2290; 200	-0,68	-0,34	-2,53	-1,26	7,57	3,76	2,40	1,19
	32		36		40		43	
	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)
ZIM 1842; 400	46,53	11,81	59,51	15,10	66,15	16,79	66,23	16,81
ZIM 1842; 200	-0,93	-0,47	-4,07	-2,06	0,27	0,14	0,57	0,29
ZIM 2287; 200	2,92	1,46	7,44	3,73	8,08	4,05	5,90	2,96
ZIM 2290; 200	7,43	3,69	6,25	3,10	5,17	2,57	6,27	3,11

PRILOGA G2: Relativna poraba fruktoze pri alkoholni fermentaciji gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev in konc. fru (g/l)	Potek fermentacije (dan)							
	4		7		11		14	
	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)
ZIM 1842; 400	36,40	10,01	22,35	6,15	31,76	8,74	27,66	7,61
ZIM 1842; 200	16,45	8,75	15,54	8,27	24,25	12,90	30,15	16,03
ZIM 2287; 200	24,55	13,01	21,46	11,37	40,40	21,41	46,00	24,37
ZIM 2290; 200	18,49	9,65	21,43	11,19	30,15	15,74	36,17	18,88
	18		21		25		28	
	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)
ZIM 1842; 400	45,05	12,39	56,52	15,55	61,57	16,94	64,85	17,84
ZIM 1842; 200	37,77	20,09	45,60	24,25	49,77	26,47	56,11	29,85
ZIM 2287; 200	48,61	25,76	53,14	28,16	62,62	33,18	70,72	37,47
ZIM 2290; 200	39,52	20,64	47,05	24,56	57,18	29,86	61,82	32,28
	32		36		40		43	
	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)	Poraba (g/l)	Relativna poraba (%)
ZIM 1842; 400	76,61	21,07	93,09	25,61	104,10	28,64	102,48	28,19
ZIM 1842; 200	58,96	31,36	58,82	31,28	65,28	34,72	68,69	36,53
ZIM 2287; 200	74,55	39,50	80,08	42,43	84,87	44,97	87,66	46,45
ZIM 2290; 200	67,47	35,23	69,08	36,07	72,70	37,96	76,75	40,08

PRILOGA H: Spreminjanje vrednosti pH v gojiščih CDM med alkoholno fermentacijo s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev; konc. glc/fru (g/l)	Potek fermentacije (dan)												
	0	4	7	11	14	18	21	25	28	30	36	40	43
ZIM 1842; 400/0	3,97	3,93	3,86	3,87	3,89	3,90	3,93	3,93	3,93	3,95	3,96	3,96	3,98
ZIM 1842; 0/400	3,94	3,89	3,83	3,80	3,80	3,80	3,82	3,82	3,82	3,83	3,84	3,84	3,85
ZIM 1842; 200/200	3,97	3,91	3,84	3,82	3,82	3,81	3,83	3,83	3,82	3,83	3,83	3,83	3,84
ZIM 2287; 200/200	3,97	3,91	3,84	3,82	3,82	3,83	3,85	3,84	3,85	3,86	3,86	3,87	3,88
ZIM 2290; 200/200	3,97	3,92	3,85	3,83	3,83	3,84	3,85	3,84	3,84	3,85	3,85	3,85	3,86

PRILOGA I: Spreminjanje vrednosti OD₆₅₀ med alkoholno fermentacijo gojišč CDM zaradi rasti kvasovke *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so tudi vrednosti standardnih odklonov (SD) in koeficientov variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev in konc. glc/fru (g/l)	Potek fermentacije (dan)											
	0			4			7			11		
	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	0,195	0,005	2,5	0,443	0,028	6,3	0,542	0,054	10,0	0,555	0,018	3,3
ZIM 1842; 0/400	0,197	0,005	2,3	0,440	0,124	28,2	0,461	0,012	2,7	0,494	0,003	0,5
ZIM 1842; 200/200	0,170	0,003	1,5	0,411	0,017	4,0	0,436	0,017	3,8	0,456	0,013	2,9
ZIM 2287; 200/200	0,204	0,006	2,8	0,443	0,022	5,0	0,533	0,024	4,4	0,569	0,011	1,9
ZIM 2290; 200/200	0,163	0,005	3,0	0,430	0,030	7,0	0,462	0,035	7,5	0,489	0,027	5,6
	14			18			21			25		
	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	0,571	0,021	3,6	0,577	0,003	0,6	0,598	0,009	1,4	0,609	0,015	2,5
ZIM 1842; 0/400	0,507	0,004	0,8	0,539	0,021	3,8	0,588	0,024	4,1	0,618	0,030	4,8
ZIM 1842; 200/200	0,469	0,020	4,3	0,502	0,020	3,9	0,523	0,020	3,8	0,550	0,024	4,3
ZIM 2287; 200/200	0,609	0,010	1,6	0,658	0,013	2,0	0,698	0,019	2,7	0,726	0,012	1,6
ZIM 2290; 200/200	0,505	0,027	5,4	0,535	0,038	7,0	0,555	0,032	5,8	0,582	0,038	6,5
	28			32			36			40		
	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)	Povp.	SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	0,627	0,014	2,2	0,630	0,017	2,8	0,659	0,018	2,7	0,672	0,015	2,3
ZIM 1842; 0/400	0,656	0,042	6,4	0,681	0,034	4,9	0,706	0,050	7,2	0,723	0,039	5,4
ZIM 1842; 200/200	0,579	0,033	5,7	0,598	0,030	5,0	0,613	0,036	5,8	0,635	0,044	6,9
ZIM 2287; 200/200	0,765	0,011	1,4	0,778	0,007	0,9	0,801	0,004	0,5	0,825	0,013	1,6
ZIM 2290; 200/200	0,618	0,034	5,6	0,628	0,036	5,7	0,655	0,026	4,0	0,678	0,034	5,0
	43											
	Povp.	SD	KV (%)									
ZIM 1842; 400/0	0,649	0,011	1,7									
ZIM 1842; 0/400	0,715	0,046	6,4									
ZIM 1842; 200/200	0,638	0,041	6,3									
ZIM 2287; 200/200	0,828	0,011	1,4									
ZIM 2290; 200/200	0,691	0,028	4,1									

PRILOGA J: Sinteza CO₂ (g) in dCO₂/dt (g/l/dan) med alkoholno fermentacijo gojišč CDM s kvasovko *C. stellata* (ZIM 1842). Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

CO ₂ (g)	Potek fermentacije (dan)												
	0	4	7	11	14	18	21	25	28	32	36	40	43
Konc. glc/fru v gojišču (g/l)													
ZIM 1842 in 400/0	0,0	2,3	3,7	6,7	8,3	10,7	12,3	14,0	15,7	17,3	18,3	19,3	19,3
ZIM 1842 in 0/400	0,0	5,0	9,7	16,0	19,7	24,3	27,7	31,7	33,7	37,0	39,0	42,0	44,0
ZIM 1842 in 200/200	0,0	3,3	7,0	12,7	16,0	19,7	22,3	25,7	27,7	30,7	32,0	34,0	34,7
ZIM 2287 in 200/200	0,0	5,3	10,3	17,3	21,0	25,3	28,3	32,7	35,7	39,0	41,7	44,3	46,0
ZIM 2290 in 200/200	0,0	4,0	8,0	14,7	17,3	21,7	24,0	27,3	30,0	32,3	34,0	36,0	37,7
dCO ₂ /dt (g/l/dan)													
ZIM 1842 in 400/0	0,0	0,58	0,52	0,61	0,60	0,59	0,59	0,56	0,56	0,54	0,51	0,48	0,45
ZIM 1842 in 0/400	0,0	1,25	1,38	1,45	1,40	1,35	1,32	1,27	1,20	1,16	1,08	1,05	1,02
ZIM 1842 in 200/200	0,0	0,83	1,00	1,15	1,14	1,09	1,06	1,03	0,99	0,96	0,89	0,85	0,81
ZIM 2287 in 200/200	0,0	1,33	1,48	1,58	1,50	1,41	1,35	1,31	1,27	1,22	1,16	1,11	1,07
ZIM 2290 in 200/200	0,0	1,00	1,14	1,24	1,24	1,20	1,14	1,09	1,07	1,01	0,94	0,90	0,88

PRILOGA K: Povprečne količine suhe biomase (g) ob inokulaciji in po 43-dnevni alkoholni fermentaciji gojišč CDM s kvasovko *C. stellata*. Predstavljeni so rezultati obeh delov poskusa (dela, kjer smo uporabili gojišče CDM z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza in dela, kjer smo uporabili tri različne seve kvasovke *C. stellata*). Podane so tudi vrednosti standardnih odklonov (SD) in koeficientov variabilnosti (KV) (%). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Sev; konc. glc/fru (g/l)	Suha biomasa ob inokulaciji			Suha biomasa po 43. dnevni fermentaciji		
	Povprečje (g)	SD	KV (%)	Povprečje (g)	SD	KV (%)
ZIM 1842; 400/0	0,354	0,08	22,96	0,512	0,11	20,84
ZIM 1842; 0/400	0,333	0,07	21,32	0,554	0,03	4,70
ZIM 1842; 200/200	0,363	0,00	0,00	0,419	0,03	6,33
ZIM 2287; 200/200	0,392	0,12	30,33	0,642	0,06	8,78
ZIM 2290; 200/200	0,329	0,11	32,30	0,554	0,09	17,08