

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sonja PRPAR

**VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA
POTEK ALKOHOLNE FERMENTACIJE S
KVASOVKO *Saccharomyces cerevisiae***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Sonja PRPAR

**VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA POTEK
ALKOHOLNE FERMENTACIJE S KVASOVKO**
Saccharomyces cerevisiae

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF GLUCOSE/FRUCTOSE RATIO ON
ALCOHOLIC FERMENTATION WITH *Saccharomyces cerevisiae***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

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.

Sonja Prpar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 663.252.41:577.15(043)=863
KG kvasovke/vinske kvasovke/*Saccharomyces cerevisiae*/kemijsko definiran mošt/
alkoholna fermentacija/glukoza/fruktoza/etanol/glikolitičnimi/heksokinaza/
fosfofruktokinaza/piruvat kinaza
AV PRPAR, Sonja
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 2005
IN VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA POTEK ALKOHOLNE
FERMENTACIJE S KVASOVKO *Saccharomyces cerevisiae*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XIII, 65 str., 9 pregl., 18 sl., 16 pril., 87 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Na podlagi delovne hipoteze, da višje koncentracije fruktoze inhibitorno delujejo na potek alkoholne fermentacije mošta s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, smo skušali dokazati zaustavitev fermentacije ob povišani koncentraciji fruktoze v gojišču oziroma upočasnjeno porabo fruktoze. Kot rastni medij smo uporabili kemijsko definiran mošt, ki je vseboval različna razmerja glukoze in fruktoze. Skupna začetna koncentracija sladkorjev je bila 400 g/l. Med potekom alkoholne fermentacije smo po vzorčenju spremljali vrednost pH bioprocenčne brozge, sproščanje CO₂, spreminjanje vrednosti OD₆₅₀, ter z analizami HPLC porabo glukoze in fruktoze ter nastajanje nekaterih ključnih metabolitov fermentacije - etanola, glicerola in oetne kisline. Preverili smo tudi aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze, fosfofruktokinaze in piruvat kinaze. V drugem delu poskusa smo se osredotočili na del fermentacije, ki poteka najbolj burno. To pomeni, da se takrat porabi največ sladkorjev oziroma se sprosti največja količina CO₂. Določili smo ga glede na rezultate celotne fermentacije v prvem delu poskusa. Določali smo aktivnosti glikolitičnih encimov ter porabo sladkorjev in sintezo etanola, glicerola in oetne kisline. Ugotovili smo, da nižje razmerje glukoza/fruktoza v mediju povzroči upočasnitev alkoholne fermentacije. Ko je v mediju koncentracija fruktoze višja, se tvori manj etanola in zato tudi manjša količina CO₂ in manj drugih kvasnih metabolitov. Povišane koncentracije fruktoze, ki upočasnijo kvasni metabolizem, vplivajo tudi na aktivnost glikolitičnih encimov. Obstaja več možnih vzrokov, ki imajo za posledico upočasnjeno fermentacijo fruktoze. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave, da bi na molekularnem nivoju okarakterizirali kinetiko in mehanizem porabe fruktoze med enološko fermentacijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 663.252.41:577.15(043)=863
CX yeasts/wine yeasts/*Saccharomyces cerevisiae*/chemically defined must/
alcoholic fermentation/glucose/fructose/ethanol/glycolytic enzymes /hexokinases /
phosphofructokinases/pyruvate kinases
AU PRPAR, Sonja
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 2005
TI THE INFLUENCE OF GLUCOSE/FRUCTOSE RATIO ON ALCOHOLIC
FERMENTATION WITH *Saccharomyces cerevisiae*
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 65 p., 9 tab., 18 fig., 16 ann., 87 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The objective of our studies was to determine if higher concentration of fructose in the growth medium during enological fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* has an inhibitory effect on fermentation or if it causes a slower consumption of fructose from the medium. As 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 production of ethanol, glycerol and acetic acid were determined by HPLC after sampling every 3 to 4 days. We also checked specific activities of key glycolytic enzymes hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. During the second part of the experiment we focused on the most vigorous part of fermentation. The part where the consumption of sugar is at its peak as is the formation of ethanol and CO₂. We determined this part through obtained data at the first part of our experiment. At this point we also determined activities of glycolytic enzymes, consumption of sugars and production of some key products of alcoholic fermentation. We have shown that the lower ratio of glucose to fructose in the growth medium slows down alcoholic fermentation. As a consequence the yeast fermenting media with more fructose form less ethanol, CO₂ and other yeast metabolites. Higher concentration of fructose has also an impact on specific activities of some glycolytic enzymes. There are several possible factors which lead to slower fermentation of fructose. Further investigation is needed to characterize the kinetics and mechanisms of fructose utilisation during enological fermentation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK.....	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNA HIPOTEZA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA ENOLOŠKO FERMENTACIJO	4
2.1.1 Možni vzroki za preferenčno porabo glukoze tekom fermentacije	4
2.2 GROZDNI SOK; SUBSTRAT ZA RAST KVASOVK	6
2.2.1 Sestava grozdnega soka.....	6
2.2.1.1 Sladkorji	6
2.2.1.2 Dušik.....	6
2.2.1.3 Ostale komponente	7
2.3 ALKOHOLNA FERMENTACIJA – Metabolizem sladkorjev pri <i>S. cerevisiae</i> ..	7
2.3.1 Crabtree efekt in katabolna represija	8
2.3.2 Alkoholna fermentacija - Glikoliza in metabolizem piruvata v etanol ..	8
2.3.3 Uravnavanje poti glikolize	11
2.3.3.1 Transport sladkorjev v celico	11
2.3.3.2 Fosforilacija sladkorjev (Nivo heksokinaze).....	12
2.3.3.3 Nivo fosfofruktokinaze.....	13
2.3.3.4 Nivo piruvat kinaze	13
2.4 ENOLOŠKA FERMENTACIJA.....	13
2.4.1 Tradicionalna fermentacija vina.....	14
2.4.2 Kinetika rasti kvasovk med alkoholno fermentacijo	14
2.4.3 Stresni dejavniki, ki vplivajo na rast kvasovk med fermentacijo	15
2.4.3.1 Osmotski stres in tvorba glicerola	15
2.4.3.2 Etanol.....	17
3 MATERIAL IN METODE	18
3.1 POTEK DELA.....	18
3.2 MATERIAL	20
3.2.1 Mikroorganizem	20
3.2.2 Mikrobiološka gojišča	20
3.2.2.1 Kemijsko definiran mošt (CDM) (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992)	20
3.2.2.2 Trdno gojišče YM (Kurtzman in sod., 2003)	20

3.2.3	Raztopine	21
3.2.3.1	Fiziološka raztopina.....	21
3.2.3.2	Metilensko modrilo	21
3.2.4	Reagenti	21
3.2.5	Oprema in aparature	22
3.3	METODE	23
3.3.1	Gojitvene metode	23
3.3.1.1	Metoda namnožitve biomase za vcepki	23
3.3.1.2	Anaeroben šaržni bioproces (Alkoholna fermentacija).....	23
3.3.2	Analične metode	23
3.3.2.1	Merjenje prirasta biomase z merjenjem optične gostote brozge (Raspor in sod., 2003).	23
3.3.2.2	Merjenje vrednosti pH.....	24
3.3.2.3	Spremljanje tvorbe CO ₂ (Bely in sod., 2003)	24
3.3.2.4	Določanje koncentracije glukoze, fruktoze in zunajceličnih metabolitov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) v brozgi	24
3.3.2.5	Določanje skupnega števila kvasovk in njihove živosti	24
3.3.2.6	Določanje koncentracije suhe biomase (Paš in sod., 2004).....	25
3.3.2.7	Priprava celičnega ekstrakta (Jamnik in Raspor, 2003).	25
3.3.2.8	Določanje količine topnih proteinov v celičnem ekstraktu (Bradford, 1976)	26
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 rezultatov	29
3.3.3.2	Določitev ravnih parametrov (Heijnen, 2001).....	30
4	REZULTATI	32
4.1	KULTIVACIJA KVASOVKE IN NAMNOŽEVANJE VCEPKA	33
4.2	FERMENTACIJA KEMIJSKO DEFINIRANEGA MOŠTA (CDM) S ČISTO KULTURO KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
4.2.1	Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo	34
4.2.2	Sproščanje CO ₂	35
4.2.3	Fermentacijski profili.....	36
4.2.4	Dinamika porabe sladkorjev v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem sladkorjev	39
4.2.5	Dinamika tvorbe metabolnih produktov v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem sladkorjev	41
4.2.6	Sprememba vrednosti pH medija med alkoholno fermentacijo	43
4.3	OVREDNOTENJE NAJBOLJ "BURNE" FAZE ALKOHOLNE FERMENTACIJE.....	44
4.3.1	Poraba sladkorjev.....	44
4.3.2	Tvorba metabolnih produktov in spremljanje porasta biomase	45
4.3.3	Hitrosti porabe sladkorjev in izkoristki po 7. dneh alkoholne fermentacije.....	46
4.4	SPECIFIČNA AKTIVNOST GLIKOLITIČNIH ENCIMOV	47
4.4.1	Po 7. dneh fermentacije.....	47

4.4.2	Po 42. dneh fermentacije.....	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	49
5.1	KULTIVACIJA KVASOVK IN NAMNOŽEVANJE VCEPKA	49
5.2	FERMENTACIJA KEMIJSKO DEFINIRANEGA MOŠTA (CDM) S ČISTO KULTURO KVASOVKE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
5.2.1	Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo in sproščanje CO ₂	50
5.2.2	Dinamika porabe sladkorjev in tvorbe metabolnih produktov v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem sladkorjev	51
5.3	OVREDNOTENJE NAJBOLJ "BURNE" FAZE ALKOHOLNE FERMENTACIJE.....	53
5.3.1	Poraba sladkorjev, tvorba metabolnih produktov in spremljanje porasta biomase	53
5.3.2	Hitrosti porabe sladkorjev in izkoristki	54
5.4	SPECIFIČNA AKTIVNOST GLIKOLITIČNIH ENCIMOV	54
5.5	SKLEPI.....	56
6	POVZETEK.....	57
7	VIRI	58

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Ocena živosti kvasovk in število CFU/ml po končani 42 dnevni fermentaciji v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	35
Preglednica 2: Poraba sladkorjev po 42 dnevni alkoholni fermentaciji. Rezultati so izračuni glede na začetne in končne koncentracije sladkorjev v gojiščih.	40
Preglednica 3: Poraba glukoze in fruktoze (g/l) po 7. dneh alkoholne fermentacije s kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v CDM gojišču z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.	44
Preglednica 4: Tvorba etanola, glicerola in oetne kisline (g/l) po 7. dneh alkoholne fermentacije s kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v CDM gojišču z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV (%), ki so rezultat treh neodvisnih gojitev.	45
Preglednica 5: Sprememba vrednosti pH, OD ₆₅₀ , tvorba CO ₂ , količina suhe biomase (g/l) in število CFU/ml po 7. dneh alkoholne fermentacije. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.	45
Preglednica 6: Maksimalna specifična hitrost rasti, specifične hitrosti (q) porabe sladkorjev in tvorbe etanola, glicerola in CO ₂ po 7. dneh fermentacije. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev, podan je standardni odklon (SD).	46
Preglednica 7: Izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase (Y _{X/S}) in tvorbo etanola (Y _{E/S}) po 7. dneh fermentacije. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev, podan je standardni odklon (SD).	46
Preglednica 8: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov (U/mg) po 7. dneh alkoholne fermentacije v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	47
Preglednica 9: Specifične aktivnosti glikolitičnih encimov (U/mg) po 42. dneh alkoholne fermentacije v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Metabolizem glukoze in fruktoze pri <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Boulton in sod., 1996).....	10
Slika 2: Shematski prikaz poteka prvega dela poskusa	18
Slika 3: Shematski prikaz poteka drugega dela poskusa	19
Slika 4: Rastna krivulja kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – ZIM 1927 pri 28 °C med 26 urnim aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku (200 vrt./min).	33
Slika 5: Spreminjanje vrednosti OD ₆₅₀ med alkoholno fermentacijo s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (♦; —), 300 g/l glc in 100 g/l fru (□; —), 200 g/l glc in 200 g/l fru (▲; —), 100 g/l glc in 300 g/l fru (○; —), 400 g/l fru (×; —). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.	34
Slika 6: dCO ₂ /dt med alkoholno fermentacijo s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-♦-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-○-), 400 g/l fru (-×-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	35
Slika 7: Fermentacijski profil za kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v CDM gojišču s 400 g/l glukoze. Prikazana je poraba glukoze (-■-) ter tvorba etanola (-○-) in CO ₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	36
Slika 8: Fermentacijski profil za kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v CDM gojišču s 300 g/l glukoze in s 100 g/l fruktoze. Prikazana je poraba glukoze (-■-) in fruktoze (-▲-) ter tvorba etanola (-○-) in CO ₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.....	37
Slika 9: Fermentacijski profil za kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v CDM gojišču z 200 g/l glukoze in z 200 g/l fruktoze. Prikazana je poraba glukoze (-■-) in fruktoze (-▲-) ter tvorba etanola (-○-) in CO ₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.....	37
Slika 10: Fermentacijski profil za kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v CDM gojišču s 100 g/l glukoze in s 300 g/l fruktoze. Prikazana je poraba glukoze (-■-) in fruktoze (-▲-) ter tvorba etanola (-○-) in CO ₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.....	38
Slika 11: Fermentacijski profil za kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v CDM gojišču s 400 g/l fruktoze. Prikazana je poraba fruktoze (-▲-) ter tvorba etanola (-○-) in CO ₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	38
Slika 12: Poraba glukoze med alkoholno fermentacijo s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-♦-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	39
Slika 13: Poraba fruktoze med alkoholno fermentacijo s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-○-), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	39
Slika 14: Relativna poraba glukoze in fruktoze v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-♦-); 400 g/l fru (-◇-); 300 g/l glc (-■-) in 100 g/l fru (-□-); 200 g/l glc (-▲-) in 200 g/l fru (-△-); 100 g/l glc (-●-) in 300 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.	40

- Slika 15: Tvorba etanola med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza : 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (··*··), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev..... 41
- Slika 16: Tvorba glicerola med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-□-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (··*··), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev..... 42
- Slika 17: Tvorba očetne kisline med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-□-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (··*··), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev..... 43
- Slika 18: Spreminjanje vrednosti pH med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (··*··), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev..... 43

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Sestava kemijsko definiranega mošta (CDM) (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992).
- Priloga A2: Protokol za pripravo založnih raztopin mineralov.
- Priloga A3: Protokol za pripravo založne raztopine vitaminov.
- Priloga B: Razmerja glukoze in fruktoze v posameznem kemijsko definiranem gojišču (CDM).
- Priloga C: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradford-u. Maso proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA.
- Priloga D: Zadrževalni časi glukoze, fruktoze in zunajceličnih metabolitov na koloni Aminex (BioRad).
- Priloga E: Podatki za rastno krivuljo *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 1927. Podana so povprečja treh neodvisnih gojitev (aerobna submerzna kultivacija na stresalniku, 26 ur, 200vrt./min, 28 °C).
- Priloga F1: Poraba glukoze in fruktoze, tvorba etanola, glicerola in oetne kisline (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.
- Priloga F2: Poraba glukoze (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.
- Priloga F3: Poraba fruktoze (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.
- Priloga F4: Tvorba etanola (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.
- Priloga F5: Tvorba glicerola (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.
- Priloga F6: Tvorba oetne kisline (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.
- Priloga F7: Spreminjanje vrednosti pH medija med alkoholno fermentacijo. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.
- Priloga F8: Tvorba CO₂ (g) in dCO₂/dt (g/l/dan) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.
- Priloga G: Poraba glukoze in fruktoze (g/l) po 7. dneh alkoholne fermentacije s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem sladkorjev. Podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%), glede na tri neodvisne gojitve v posameznem gojišču.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A _{340/595/650}	absorbanca pri valovni dolžini 340 nm oziroma 595 nm oziroma 650 nm
ADP	adenozim difosfat
ATP	adenozin trifosfat
BSA	goveji serumski albumin (angl. <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
CO ₂	ogljikov dioksid
EMP pot	Embden-Meyerhof-Parnas-ova pot razgradnje glukoze; glikoliza
F6P	fruktoza-6-fosfat
F1,6P ₂	fruktoza-1,6-bisfosfat
G6P	glukoza-6-fosfat
GLK	glukokinaza
h	ura
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
HXK	heksokinaza
KD (CD)	kemijsko definirano (angl. chemically defined)
KE	kolonijske enote (angl. CFU, <u>C</u> olny <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	nikotinamid-adenin-dinukleotid (reducirana oblika)
NADP ⁺	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (oksidirana oblika)
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (reducirana oblika)
OD ₆₅₀	intenziteta prepuščene sipane svetlobe pri λ 650 nm (turbidnost, motnost); optična gostota
p.a.	per analysis
Pi	ortofosfat (PO ₄ ³⁻)
PEP	fosfoenolpiruvat
PFK	fosfofruktokinaza
PYK	piruvat kinaza
R	faktor redčitve
SB	suha biomasa
SD	standardni odklon oziroma variacija
T	temperatura
U	encimska enota (Unit); količina encima, ki oksidira (reducira) 1 μmol substrata v 1 minuti
vert./min	vrtljaji na minuto
YM	gojišče s kvasnim in sladnim ekstraktom (angl. <u>Y</u> east extract - <u>M</u> alt extract)
ZIM	Zbirka Industrijskih Mikroorganizmov

SLOVARČEK

Grozdni sok: Sveži sok, pridobljen s stiskanjem zmletih grozdnih jagod.

Mošt: Delno fermentiran grozdni sok z nizko vsebnostjo etanola. V njem nastaja CO₂ kot posledica anerobnega 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 15 vol. %. V primeru zaustavitve alkoholne fermentacije ne moremo govoriti o vinu.

Alkoholna fermentacija: Je delna ali popolna sprememba glavnih sladkorjev mošta v etanol, ogljikov dioksid in druge končne metabolite. Proces je kompleks ekoloških in biokemijskih interakcij med različnimi vrstami kvasovk, bakterij, gliv in njihovih virusov.

1 UVOD

Zgodovina uporabe vinskih kvasovk se začne s pojavom prvih civilizacij. Že leta 7400 pr.n.št. so omenjali kvasovke. Praksa pridelave vina se je iz Sredozemlja postopoma razširila po celem svetu, na klimatsko ugodna področja za rast vinske trte. Fermentacija mošta ni bila poznana vse do leta 1863, ko je Pasteur dokazal, da so kvasovke odgovorne za biotransformacijo sladkorjev, prisotnih v moštu, v etanol in CO₂ (Pretorius, 2000).

Med alkoholno fermentacijo vina se zaradi mikrobne aktivnosti glavna sladkorja v moštu glukoza in fruktoza sočasno pretvorita v etanol, ogljikov dioksid in številne druge metabolite. Slednji nastajajo v manjših količinah, a so vseeno pomembni (Fleet in Graham, 1992). Pretvorba je posledica metabolnega delovanja kvasovk, ki jih uvrščamo v rod *Saccharomyces*. *S. cerevisiae* je glavna kvasovka udeležena v alkoholni fermentaciji vina. V vinarstvu uporabljajo selekcionirane seve *S. cerevisiae* kot starterje za inokulacijo mošta iz katerega le-ti nato proizvedejo vino. Mošt vsebuje enaki količini glukoze in fruktoze, celokupna vsebnost heksoz pa je med 160 do 300 g/l (Henschke in Jiranek, 1992).

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* je poznana po preferenci do glukoze. Čeprav fruktozo porablja sočasno z glukozo, glukoza prvo odstranjeni iz medija. Posledično se razmerje glukoza/fruktoza (GF) v moštu tekom fermentacije močno zniža. Zato preostali sladkor v vinu vsebuje več fruktoze kot glukoze (Berthels in sod., 2004). Fruktoza je približno dvakrat bolj sladka kot glukoza in tako močno vpliva na končno sladkost vina (Boulton in sod., 1996). Je glavni vzrok nezaželene sladkosti suhih vin. Velike končne koncentracije fruktoze v vinu pomenijo nižjo vsebnost etanola in s tem večjo nevarnost mikrobne kvara vina. Gafner in sod. (1996) so ugotovili, da prezgodnjo zaustavitev fermentacije vina velikokrat povzroči nenavadno nizko razmerje med glukozo in fruktozo. V vinu ostanejo velike količine nefermentiranega sladkorja (>2-5 g/l). Vinarjem zaustavljene ali upočasnjene fermentacije (angl. stuck or sluggish fermentations) predstavljajo velik problem (Bisson in Butzke, 2000).

Vzrok za razliko v GF razmerju, ki se tekom alkoholne fermentacije spreminja, ni znan. Možnih je več razlogov (Berthels in sod., 2004):

- transport sladkorjev v kvasno celico
- fosforilacijo sladkorjev po vnosu v celico
- razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih glukoze in fruktoze
- kvasovka drugače zaznava glukozo kot fruktozo
- način vzdrževanja katabolne represije med alkoholno fermentacijo z glukozo oziroma fruktozo
- vpliv limitnih hranil (npr. asimilirajoči vir dušika)
- vpliv etanola, ki nastaja tekom fermentacije

Fermentativno kapaciteto kvasovk so največ proučevali na molekularnem nivoju. Laboratorijski pogoji velikokrat niso bili podobni enološkemu pogojem. Med enološko fermentacijo mošta namreč veliko različnih dejavnikov vpliva na potek le-te. Do sedaj so večino raziskav enoloških fermentacij naredili v medijih, ki so kot edini vir ogljika vsebovali le glukozo. Tako je malo informacij o vplivu fruktoze na proces vinifikacije.

1.1 CILJI RAZISKOVANJA IN DELOVNA HIPOTEZA

V zrelih grozdnih jagodah in kasneje v moštu sta glukoza in fruktoza, ki sta hkrati najvažnejša fermentabilna sladkorja, prisotna v enakem razmerju. Med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* pa se glukoza hitreje porablja kot fruktoza in v primeru zaustavljenih fermentacij je razmerje glukoza/fruktoza zelo zmanjšano.

Pri vinskih fermentacijah v zadnjem času prihaja do problemov zaradi prehitre zaustavitve fermentacije. Posledično dobimo vino z manjšo vsebnostjo etanola in večjim deležem preostalega sladkorja. Analiza je zato nujno potrebna, da ugotovimo možne vzroke zaustavitve fermentacije in jo tako lahko preprečimo s predhodno analizo mošta. Eden izmed vzrokov prehitre zaustavitve fermentacije je lahko fruktoza, ki lahko preko različnih mehanizmov povzroči zaustavitev.

Namen dela je bil ugotoviti ali zmanjšanje razmerja glukoza/fruktoza v mediju vpliva na potek fermentacije oziroma kako povišana koncentracija fruktoze v mediju vpliva na potek enološke fermentacije. 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.

Delovna hipoteza:

- ✓ Dovolj nizko razmerje glukoza/fruktoza v mediju povzroči zaustavitev fermentacije oziroma drugače - povišana koncentracija fruktoze inhibira alkoholno fermentacijo vina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VPLIV RAZMERJA GLUKOZA/FRUKTOZA NA ENOLOŠKO FERMENTACIJO

Eden glavnih ciljev med večino enoloških fermentacij je dokončanje fermentacije, to pomeni, da je koncentracija preostalih fermentabilnih sladkorjev v vinu v območju 2-4 g/l (Alexandre in Charpentier, 1998). Med enološko fermentacijo vina poraba fruktoze iz medija vedno zaostaja za porabo glukoze. Vzrok tega pojava ni poznan in verjetno ni odvisen samo od fermentativne kapacitete kvasovke. Možni vzroki za preferenčno porabo glukoze in ne fruktoze z glukofilno vinsko kvasovko *S. cerevisiae* so transport sladkorjev, fosforilacija sladkorjev, razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih obeh sladkorjev, zaznavanje količine sladkorjev s sensorji, katabolna represija, omejitve s hranili (asimilirajoči vir dušika), inhibitorno delovanje etanola in osmotski stres zaradi povišanih koncentracij sladkorjev v mediju (Berthels in sod., 2004).

Med alkoholno fermentacijo lahko pride do upočasnitve fermentacije, ali pa celo do prezgodnje zaustavitve. Razmerje med glukozo in fruktozo v moštu in kasneje med fermentacijo je signal za zaustavitev fermentacije. S poskusi so inducirali zaustavitev fermentacije z znižanjem razmerja med glukozo in fruktozo v mediju do 0,1 ali celo nižje (Gafner in sod., 1996). Poleg povečane vsebnosti fruktoze v drugem delu enološke fermentacije na zaustavitev oziroma upočasnitev fermentacije lahko vplivajo še preostanki fungicidov, inhibitorno delovanje maščobnih kislin, prisotnost SO₂, anaerobni pogoji rasti in nizke temperature fermentacije (Fugelsang, 1996). Znižanje stopnje fermentacije je največkrat posledica sinergističnih učinkov zgoraj naštetih faktorjev.

Še posebej je problem upočasnjene oziroma zaustavljene fermentacije opazen pri fermentaciji grozdnega soka pridobljenega s pozno trgatvijo oziroma pri t.i. ledenih vinih. Vsebnost fermentabilnih sladkorjev je tu višja kot v grozdnem soku pridobljenem med "običajno" trgatvijo. Ekonomsko pomembno je, da ugotovimo vzrok zaustavitve oziroma upočasnitve fermentacije, da ga lahko preprečimo in se izognemo stroškom ponovnega zagona teh fermentacij oziroma izpadu produkta zaradi tvorbe produkta, ki ima preveč preostalega sladkorja in ga ne moremo tržiti kot vino.

2.1.1 Možni vzroki za preferenčno porabo glukoze tekom fermentacije

Razmerje glukoza/fruktoza (GF) se tekom fermentacije spreminja. Berthels in sod. (2004) so v poskusu dokazali, da na začetku, ko je hitrost porabe sladkorjev maksimalna, GF razlika ostane relativno majhna. Ko pa se je celotna poraba sladkorjev upočasnila, se je poraba fruktoze bolj upočasnila kot poraba glukoze, zato se je GF razmerje močno zmanjšalo. Pri nihanju GF razmerja tekom fermentacije gre za tipičen vzorec, ki je odvisen od časa in seva (Berthels in sod., 2004).

Metabolna pot fermentacije fruktoze je zelo podobna poti fermentacije glukoze. Imata celo iste transporterje, čeprav je njihova afiniteta za glukozo višja kot za fruktozo (Bisson in

Fraenkel, 1983; D'Amore in sod., 1989). Tako je transport sladkorjev prvi možni kandidat za razliko v fermentaciji glukoze in fruktoze. Po transportu je glukoza fosforilirana z glukokinazo (GLK), heksokinazo1 (HXK1) in heksokinazo2 (HXK2), fruktoza pa le s heksokinazama (Flores in sod., 2000). Afiniteta heksokinaz je višja za glukozo.

Fosforilacijski korak je drugi kandidat za razliko v fermentaciji glukoze in fruktoze. Po fosforilaciji fruktoze fruktoza-6-fosfat vstopi v glikolizo s konverzijo v fruktoza-1,6-bisfosfat, medtem ko mora biti produkt fosforilacije glukoze, glukoza-6-fosfat, konvertiran najprej v fruktoza-6-fosfat s fosfogluko-izomerazo (PGI) (Boulton in sod., 1996; Flores in sod., 2000). Vzrok za GF razliko je zato lahko korak v transportu in/ali fosforilaciji v fermentacijski poti. Obstajajo pa še druge možnosti. Kvasovke imajo sladkorne senzorje, vsaj eden od njih ima drugačno afiniteto za glukozo kot za fruktozo (Rolland in sod., 2002).

Katabolna represija je še en pomemben proces v kvasovki na katerega glukoza in fruktoza različno vplivata. V prisotnosti hitro fermentabilnih sladkorjev, kot sta glukoza in fruktoza, kvasovke reprimirajo ekspresijo genov, ki so vpleteni v respiracijo, glukoneogenezo in metabolizem alternativnih virov ogljika (Carlson, 1999). Za vzdrževanje katabolne represije z glukozo je verjetno potrebna HXK2, s fruktozo pa HXK1 ali HXK2 (de Winde in sod., 1996). Represijo s fruktozo tako lahko sproži drugačen mehanizem v primerjavi z represijo z glukozo.

Asimilirajoči dušik je esencialno hranilo in je kritičen za učinkovitost fermentacije. Tekom fermentacije mošta velikokrat postane limitni dejavnik (Salmon, 1989). Razpad vira dušika in hiter upad sladkornih transporterjev v stacionarni fazi rasti naj bi bili odgovorni za inaktivacijo transporta sladkorjev in posledično redukcijo stopnje fermentacije proti koncu alkoholne fermentacije. Berthels in sod. (2004) so z dodajanjem vira dušika v drugem delu fermentacijskega procesa dokazali, da pride po dodatku do znatno povečane porabe fruktoze glede na porabo glukoze. Ta naj bi bila posledica preprečitve razgradnje heksoznih prenašalcev z višjo afiniteto za fruktozo kot posledica dodatka vira dušika.

Fruktoza je ketoza, v raztopini jo je približno 30 % v furanozni obliki. Glukoza je aldoza, 99,9 % jo je v piranozni obliki. Glukoza in ostali sladkorji so transportirani večinoma v piranozni obliki, redko pa v furanozni obliki, zato je dejanska koncentracija fruktoze primerne za transport pod njeno totalno koncentracijo v mediju (Flood in sod., 1996). Razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih obeh sladkorjev lahko razložijo nižjo afiniteto transportnega sistema in heksokinaz za fruktozo.

Poleg zgoraj naštetih možnih vzrokov za razliko v porabi glukoze in fruktoze med enološko fermentacijo je eden od možnih dejavnikov tudi vpliv povišanih koncentracij etanola, ki se akumulira med fermentacijo. Potrebna je karakterizacija vzroka za GF razliko na molekularnem nivoju.

2.2 GROZDNI SOK; SUBSTRAT ZA RAST KVASOVK

Senzorične lastnosti vina so posledica kemijske sestave mošta, na katero vplivajo različni faktorji: sorta grozdja, geografski in vitikulturni pogoji kultivacije grozdja, ekologija mikrobov na grozdju, med procesom fermentacije pa sama tehnologija proizvodnje vina (Fleet, 2003). Proces fermentacije in kemijska sestava grozdnega soka sta med naštetimi najpomembnejša.

2.2.1 Sestava grozdnega soka

2.2.1.1 Sladkorji

Poznavanje sestave grozdnega soka, kot substrata za rast kvasovk, je pomembno pri razumevanju metabolizma sladkorjev med fermentacijo, saj vpliva dostopnost hranil na metabolno aktivnost kvasovk. Splošno vsebuje grozdni sok 140-260 g/l sladkorjev. Vsebnost sladkorjev narašča s podaljšanim zorenjem grozdja. Saharoza v grozdni jagodi se cepi v fruktozo in glukozo, zato je v grozdnem soku ekvimolarna koncentracija glukoze in fruktoze, saharoza pa je le v sledovih. Vsebuje še manjše količine pentoz, a teh kvasovka *S. cerevisiae* ne porablja kot substrat za rast in energijo (Bisson, 1992).

Rast kvasovk je odvisna od koncentracije sladkorjev. Študije enoloških fermentacij s čistimi kulturami *S. cerevisiae* kažejo, da s porastom začetnih koncentracij sladkorjev nad 200 g/l pride do upočasnitve hitrosti fermentacije in do možne prezgodnje zaustavitve procesa fermentacije. Visoke koncentracije sladkorjev vplivajo na rast kvasovk, pride do podaljšanja lag faze rasti, do znižanja rastne hitrosti in do manjših celičnih populacij (Fleet in Heard, 1992).

2.2.1.2 Dušik

Vsebnost dušika v moštu je variabilna, odvisna od vinorodnega okoliša in prakse dela v vinogradu, zrelosti grozdja in tehnološkega procesa predelave grozdja v vino (Henschke in Jiranek, 1992). Količina niha od 26-2400 mg N/l, minimalna vrednost asimilirajočega vira dušika v grozdnem soku, ki omogoča popolno alkoholno fermentacijo je 120-140 mg N/l (Bisson, 1992). Proste amino kisline (alanin, arginin, aspartat, asparagin, glutamat, glutamin, prolin, serin in treonin) in amonijeve ioni so glavni viri dušika. Kvasovke jih tekom fermentacije porabljajo za rast. Velikokrat pride zaradi intenzivne obdelave grozdnega soka do pomanjkanja vira dušika v moštu. Potreba kvasovk po viru dušika se poviša tudi zaradi povečanih koncentracij sladkorjev v mediju. Grozdni sok lahko vsebuje veliko dušika ali pa je z njim omejen. Posledica omejitev z virom dušika je prezgodnja zaustavitev fermentacije oziroma počasen potek fermentacije (Salmon, 1989). Vsebnost dušika vpliva na hitrost porabe sladkorjev na dva načina, in sicer tako da vpliva na celokupno število celic oziroma regulira tok vira ogljika skozi glikolizo.

2.2.1.3 Ostale komponente

Grozdni sok vsebuje dovolj vitaminov (inositol, tiamin, biotin, pantotenska kislina, nikotinska kislina) in mineralov, fosfata ter soli v sledovih (Boulton in sod., 1996). Največkrat sok vsebuje vsa hranila v dovolj velikih količinah za rast kvasovk, lahko pa nima komponent, ki so potrebne za toleranco na etanol in vzdrževanje porabe sladkorjev v stacionarni fazi rasti. Gre za t.i. faktorje preživetja, to so steroli in nenasičene maščobne kisline in so potrebni za vzdrževanje integritete plazemske membrane (Fugelsang, 1996). Kontrolirano aeriranje grozdnega soka pred začetkom fermentacije ali v zgodnjih stopnjah fermentacije deluje stimulatorno na rast kvasovk in fermentacijo, saj omogoča biosintezo lipidov (Blateyron in sod., 2001). Manipuliranje s sestavo grozdnega soka (npr. dodatek žveplovega dioksida) lahko vpliva na spekter končnih produktov, ki nastanejo med katabolizmom sladkorja.

Vrednost pH grozdnega soka niha med 3,0 in 4,0, to je odvisno predvsem od vinske in jabolčne kisline. Rast *S. cerevisiae* se upočasni, če pH pade iz 3,5 na 3,0 (Fleet in Heard, 1992).

V grozdnem soku so lahko prisotni tudi ostanki fungicidov. Ti različno vplivajo na kvasno populacijo, odvisno od njihove koncentracije in tipa. Lahko pride do počasnejšega začetka rasti kvasovk, do upočasnitve rasti tekom fermentacije, manjšega doprinosa med rastjo in do pospešenega odmiranja celic po zaustavitvi rasti. Posledica teh vplivov so lahko počasne nepopolne fermentacije (Fleet in Heard, 1992).

2.3 ALKOHOLNA FERMENTACIJA – Metabolizem sladkorjev pri *S. cerevisiae*

Kvasovke lahko izkoriščajo različne sladkorje kot vir ogljika in energije. Metabolna usoda sladkorjev je posledica disimilativnih poti fermentacije in respiracije in asimilativnih poti glukoneogeneze in sinteze ogljikovodikov (Walker, 2000). Glikoliza je poglavitna pot razgradnje sladkorjev, pri tem nastanejo piruvat, NADH in ATP (van Dijken in sod., 1993). Med enološko fermentacijo kvasovke poleg glukoze porabljajo tudi fruktozo. Alternativno pot razgradnje sladkorjev predstavlja pot pentoza fosfata (PPF). Je metabolna pot odgovorna za nastanek NADPH, ki je potreben za biosintetske reakcije in ribuloze-5-P za sintezo nukleinskih kislin in nukleotidnih kofaktorjev. Je tudi vir eritroze-4-P za sintezo aromatskih aminokislin (Flores in sod., 2000). V večini mikroorganizmov se 66 do 80 % glukoze metabolizira po EMP poti, preostanek pa po poti PPF (Ratledge, 1987).

2.3.1 Crabtree efekt in katabolna represija

Kvasovka *S. cerevisiae* proizvaja etanol s fermentativnim metabolizmom ne glede na dostopnost kisika. Dejansko koncentracija glukoze ne sme presegati 50 mg/l, drugače tudi pod oksidativnimi pogoji poteka fermentacija. Gre za fenomen imenovan Crabtree efekt in je posledica katabolne represije. Inhibicija respiracije s presežkom glukoze je posledica omejene respiratorne kapacitete *S. cerevisiae*. V aerobnih pogojih se le majhen del glukoze razgradi z respiratornim metabolizmom, ker pride do inhibicije respiratornih genov in inaktivacije respiratornih encimov z glukozo (Carlson, 1999; Dennis in sod., 1999). Proizvodnja etanola tudi pod aerobnimi pogoji je posledica velikega vnosa glukoze, ki se oksidira do piruvata. Zaradi poplave piruvata se ta odstrani tako, da se konvertira v etanol. *S. cerevisiae* je Crabtree pozitivna kvasovka. Crabtree efekt ni omejen samo na glukozo, kvasovke lahko aerobno fermentirajo tudi fruktozo (Walker, 1998).

Metabolizem fermentabilnih sladkorjev s kvasovko *S. cerevisiae* povzroči mnoge spremembe v metabolnem stanju kvasnih celic. Pride do povečanega glikolitičnega toka, ki ga spremlja nepopolna oksidacija oziroma alkoholna fermentacija sladkorjev ter do represije respiracije in glukoneogeneze (Carlson, 1999). To je posledica t.i. glavne poti represije. Narava signala, ki v celici kvasovke sproži katabolno represijo, ni točno poznana. Možno je, da zaznavanje sladkorjev in vzpostavitev katabolne represije kontrolira interaktivno mrežje, ki ga sestavljajo vse tri sladkorne kinaze (HXK1, HXK2 in GLK1) in Ras-cAMP pot (de Winde in sod., 1996; Sanz in sod., 1996). Potreben je transport in fosforilacija sladkorja ne pa nadaljen metabolizem sladkorja. Teusink in sod. (1998) in Ye in sod. (1999) domnevajo da gre za signal, ki je posledica intracelularnih koncentracij glukoze ali fruktoze. Signaliziranje s sladkorji in represija transkripcije, ki ju inducirata glukoza ali fruktoza, se med sabo razlikujeta in sta tako odvisna od narave dostopnega fermentabilnega sladkorja (de Winde in sod., 1996).

2.3.2 Alkoholna fermentacija - Glikoliza in metabolizem piruvata v etanol

Glikoliza (Embden-Meyerhof-Parnasova (EMP) pot ali pot heksoze-difosfata) je glavna pot porabe glukoze in fruktoze v *S. cerevisiae* (Slika 1). Gre za zaporedje metabolnih korakov. Iz glukoze (ali fruktoze) na koncu nastane piruvat (Boulton in sod., 1996). Razdelimo jo lahko v dva dela. V prvem delu pride do preoblikovanja molekule glukoze do gliceraldehid-3-fosfata. Tu redoks reakcije še niso vključene, porablja pa se ATP.

Potek prvega dela glikolize, ki se začne po vstopu glukoze oziroma fruktoze v celico: fosforilacija glukoze v glukoza-6-fosfat (G6P) z encimom heksokinaza 1 (HXK1), heksokinaza 2 (HXK2) ali glukokinaza (GLK), pri tem se porabi ena molekula ATP, ki je donor fosfata; sledi izomerizacija G6P v fruktoza-6-fosfat (F6P) z encimom fosfoglukoza izomeraza (PGI); fosfofruktokinaza (PFK) fosforilira F6P v fruktoza-1,6-bisfosfat (F1,6P₂), tu se porabi še en ATP; F1,6P₂ encim fruktoza-1,6-bisfosfat aldolaza (FBA) pretvori v dihidroksiaceton fosfat (DHAP) in gliceraldehid-3-fosfat. Encim trioza-fosfat izomeraza (TPI) reverzibilno pretvori DHAP v gliceraldehid-3-fosfat. Tako sta končna produkta prvega dela glikolize dve molekuli gliceraldehid-3-fosfata in ADP (Boulton in

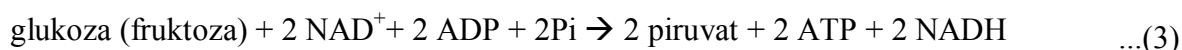
sod., 1996; Flores in sod., 2000). Razlika v prvem delu glikolize za fruktozo in glukozo: pri glikolizi fruktoze fosforilacijo lahko opravita le heksokinazi, produkt fosforilacije F6P vstopi v glikolizo s konverzijo v F1,6P₂; medtem ko mora biti G6F konvertirana najprej v F6P (Boulton in sod., 1996).



V drugem delu glikolize pride do redoks reakcij, nastajata ATP in piruvat. Potek: dve molekuli gliceraldehid-3-fosfata encim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza fosforilira z anorganskim fosfatom (Pi) in s koencimom NAD⁺, nastaneta NADH in 1,3-bifosfoglicerat; fosfoglicerat kinaza (PGK) katalizira nastanek 3-fosfoglicerata in ATP; fosfoglicerat mutaza (PGM) pretvori 3-fosfoglicerat v 2-fosfoglicerat; tega pa enolaza (ENO) pretvori v fosfoenolpiruvat (PEP), ki ga nato encim piruvat kinaza (PYK) pretvori v končna produkta piruvat in ATP (Boulton in sod., 1996; Flores in sod., 2000).



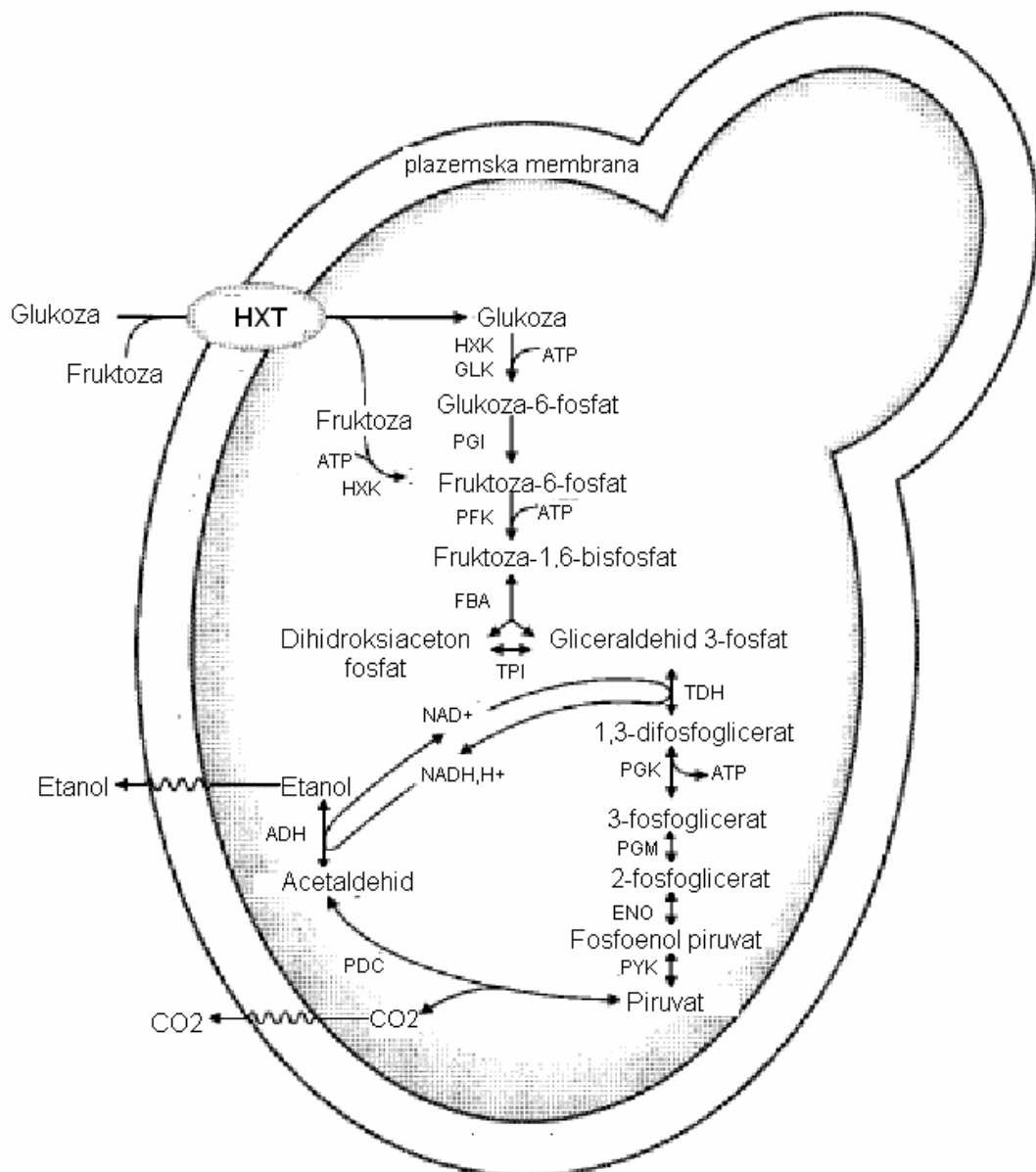
Celotna enačba glikolize:



Glavni končni produkt glikolize je piruvat, ki predstavlja zelo pomembno razvejitevno točko glikolitičnega toka med oksidativnim in fermentativnim metabolizmom (de Jong-Gubbels, 1995; Walsh in sod., 2000). Na nivoju piruvata se glikolitični tok lahko razdeli v tri smeri: karboksilacija piruvata v oksalacetat; oksidacija piruvata v acetil-CoA (respiracija); dekarboksilacija piruvata v acetaldehid (fermentacija) (van Dijken in sod., 1993).

Fermentacija je oblika metabolizma pri katerem sta začetni donor elektronov (= substrat) in končni akceptor elektronov (= produkt) organski snovi. Pri alkoholni fermentaciji je piruvat končni akceptor elektronov, glavna donorja pa sta glukoza oziroma fruktoza (Walker, 2000). Med alkoholno fermentacijo sladkorjev *S. cerevisiae* reoksidira reducirani koencim NADH, ki nastaja med glikolizo, v NAD⁺ z encimom alkohol dehidrogenaza. Prvo encim piruvat dekarboksilaza (PDC) pretvori piruvat v acetaldehid, slednjega pa encim alkohol dehidrogenaza (ADH) reducira v etanol (Slika 1). Regeneracija NAD⁺ je potrebna za vzdrževanje redoks ravnotežja in preprečitev zaustavitve glikolize (Boulton in sod., 1996). Z energetskega stališča je fermentacija zelo neučinkovit, a hiter način pridobivanja energije. Energijski izkoristek sta le dve molekuli ATP na molekulo glukoze oziroma fruktoze.

Donos biomase (izražen v gramih suhe teže na gram sladkorja) se močno razlikuje pri respiratornem ali pa fermentativnem metabolizmu. S fermentacijo iz 100 g glukoze nastane 7,6 gramov kvasne suhe biomase, z respiracijo pa do 53 gramov (Degre, 1992).



Slika 1: Metabolizem glukoze in fruktoze pri *Saccharomyces cerevisiae* (HXT (heksozni prenašalec), HXK (heksokinaza), GLK (glukokinaza), PGI (fosfoglukoza izomeraza), PFK (fosfofruktokinaza), FBA (aldolaza), TPI (triozafosfat izomeraza), TDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza), PGK (fosfoglicerat kinaza), PGM (fosfoglicerat mutaza), ENO (enolaza), PYK (piruvat kinaza), PDC (piruvat dekarboksilaza), ADH (alkohol dehidrogenaza)) (Boulton in sod., 1996).

2.3.3 Uravnavanje poti glikolize

Funkcija glikolize med pogoji enološke fermentacije je vzdrževanje visokega energetskega naboja celice (večinoma v obliki ATP) med dotokom vira ogljika (piruvat in fosfoenolpiruvat) za biosintezo (Hofmeyr, 1997). Glikolizo uravnavajo različni mehanizmi: alosterična regulacija aktivnosti glikolitičnih encimov, modifikacija proteinov in moduliranje genske ekspresije (Goncalves in Planta, 1998; Yin in sod., 2003).

Prenos sladkorjev skozi celično membrano, njihova fosforilacija, aktivnost ključnih glikolitičnih encimov, hidroliza ATP, ki je nastal med glikolizo in reoksidacija NADH, ki je nastal med delovanjem encima gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze so ključne stopnje regulacije glikolize (Larsson in sod., 2000).

Glavna koraka kontrole porabe sladkorjev sta transport in fosforilacija. Izguba aktivnosti kateregakoli od treh ireverzibilnih korakov glikolize, fosforilacija sladkorjev (HXK), aktivnost PFK ali PYK, takoj vpliva na aktivnost heksoznih prenašalcev. Posamezen encim oziroma posamezen korak ne regulira glikolitičnega toka, čeprav so nekaj časa mislili, da je encim PFK ključen za regulacijo glikolize (Goncalves in Planta, 1998). Sprememba toka glikolize vpliva na spremembo transporta glukoze oziroma fruktoze. Tako je lahko transport sladkorjev primarno mesto kontrole hitrosti glikolize. Preprečitev vnosa substrata je mogoče najboljši mehanizem preprečitve neravnovesja (= poraba in produkcija ATP) v začetnih ali poznejših reakcijah glikolize (Larsson in sod., 2000).

Kontrolo glikolitičnega toka modulira tudi prisotnost drugih dostopnih hranil, predvsem dušika. Omejitve z dušikom povzročijo izgubo aktivnosti transporterjev. Inaktivacija vnosa glukoze oziroma fruktoze zaradi omejitve z dušikom povzroči znižanje celokupne hitrosti glikolize. Ni znano kako dušik fiziološko modulira aktivnost prenašalcev. Amonij (NH_4^+) je alosterični efektor PFK ter PYK in možno da je njegov vpliv na aktivnost transporterjev indirekten (Salmon, 1989).

2.3.3.1 Transport sladkorjev v celico

Prvi korak v metabolizmu sladkorjev je njihov transport v celico. Sladkorji lahko v celico prehajajo na tri različne načine: s pasivno difuzijo, s pospešeno difuzijo (omogočajo jo prenašalci) ali pa z aktivnim transportom. Glukoza in fruktoza se transportirata s pospešeno difuzijo, proces ne zahteva energije. Prenašali naj bi se z istimi prenašalci (D'Amore in sod., 1989). Transport sladkorjev naj bi bilo ključno mesto kontrole glikolitičnega toka pod anaerobnimi pogoji (Bisson, 1992; Ye in sod., 1999).

Transport sladkorjev v *S. cerevisiae* je kompleksen, saj vključuje več prenašalcev. Zapis za heksozne prenašalce *S. cerevisiae* nosijo hxt geni. Kompletna analiza genoma je pokazala, da družina heksoznih transporterjev vsebuje 18 proteinov (HXT1-HXT17 in GAL2) in dva glukozna senzorja SNF3 in RGT2, ki sta ozko sorodna transporterjem (Reifenberger in sod., 1997; Ozcan in sod., 1998). Veliko število heksoznih transporterjev naj bi omogočalo učinkovit transport heksoz v različnih pogojih v okolju (Luyten in sod., 2002).

Vsak transporter naj bi imel bolj ali manj specifično vlogo zaradi različne specifičnosti in afinitete za substrat. HXT1 in HXT3 sta nizko afinitetna prenašalca ($K_{m_{glc}} = 20 \pm 8$ mM, $K_{m_{fru}} = 40 \pm 15$ mM). HXT6, HXT7 in GAL2 imajo visoko afiniteto za svoj substrat ($K_{m_{glc}} = 1,5 \pm 0,25$ mM, $K_{m_{fru}} = 6 \pm 2$ mM). Medtem ko imata HXT2 in HXT4 le zmerno nizko afiniteto ($K_{m_{glc}} = 10$ mM) (Bisson in Fraenkel, 1983; Reifenberger in sod. 1997; Johnston in Ozcan, 1999; Yin in sod., 2003). Transporterji se med sabo ne razlikujejo le po kinetiki ampak tudi po različnih vzorcih ekspresije. Ekspresija genov, ki nosijo zapis za heksozne transporterje, je regulirana s koncentracijo dostopnih sladkorjev (Johnston in Ozcan, 1995), z osmotskim pritiskom, omejenostjo s hranili in s fiziološkim stanjem celice. Transport heksoz je močno reguliran, saj kvasovka le tako lahko dobi dovolj veliko količino ogljika in energije pod različnimi pogoji (Meijer in sod., 1996).

Kinetika transporta glukoze v *S.cerevisiae* je regulirana z različnimi pogoji v okolju. Tako je sistem nizko afinitetnih prenašalcev konstitutivno izražen med rastjo, aktivnost se zmanjša v stacionarni fazi rasti, visoko afiniteten sistem pa je reprimiran, ko je v okolju visoka koncentracija heksoznih sladkorjev (Bisson in Fraenkel, 1983).

Pod pogoji enološke fermentacije pride do represije visokoafinitetnega sistema prenosa sladkorjev, dokler ne pride do porabe glukoze in fruktoze iz medija. Gre za močno inhibicijo s substratom, ki naj bi bila posledica multiple vezave le tega na transporter. Ob visokih koncentracijah se več kot ena molekula glukoze hkrati poskuša vezati in tako inhibira aktivnost transporterja. To so opazili le ob rasti celic v moštu, ne pa v sintetičnem mediju z visoko vsebnostjo sladkorjev (Perez in sod., 2005). Simultano izražanje večih transporterjev nakazuje na kompleksnost procesa transporta sladkorjev v celico (Luyten in sod., 2002).

2.3.3.2 Fosforilacija sladkorjev (Nivo heksokinaze)

Transportu sladkorjev v celico sledi fosforilacija. Kvasovke *Saccharomyces* imajo tri encime, ki lahko fosforilirajo glukozo: heksokinaza 1 (HXK1), heksokinaza 2 (HXK2) in glukokinaza (GLK) (Flores in sod., 2000). Samo heksokinazi lahko učinkovito fosforilirata fruktozo (Boulton in sod., 1996). Mutante brez *hpk1* in *hpk2* ne morejo vnesti fruktoze, obdržijo pa visokoafinitetni transport glukoze. Trojne mutante brez *hpk1,2* in brez *glk*, ne izražajo visokoafinitetnega sistema vnosa sladkorjev in niso sposobne vnosa sladkorjev (Bisson, 1992). Razlike v kinetiki vnosa in fosforilaciji sladkorjev so možen vzrok za hitrejšo porabo glukoze med fermentacijo v primerjavi s fruktozo. Aktivnost HXK je odvisna od prisotnosti različnih inhibitorjev. G6P, trehaloza-6-fosfat in ATP naj bi inhibirali njeno delovanje a njihova vloga ni točno pojasnjena (Larsson in sod., 2000).

Hpk2 se konstitutivno izraža in je glavni izoenzim med fermentacijo z visokimi koncentracijami heksoznih sladkorjev (Diderich in sod., 2001). Razmerje fosforilacije glukoze in fruktoze s HXK2 je približno enako (1:1). *Hpk1* naj bi bila reprimirana z glukozo. Ne pride do njene ekspresije dokler se vsa (večji del) glukoza ne porabi iz medija. Razmerje fosforilacije fruktoze s HXK1 v primerjavi z glukozo je približno 3:1. Ker se glukoza med fermentacijo porablja hitreje kot fruktoza, je koncentracija fruktoze proti koncu fermentacije višja (D'Amore in sod., 1989). Pod takimi pogoji je ekspresija *hpk1* zaželenja za vzdrževanje fermentacije (Bisson, 1992).

2.3.3.3 Nivo fosfofruktokinaze

Fosfofruktokinaza (PFK) katalizira drugi ireverzibilni korak v poti glikolize – fosforilacijo fruktoza-6-fosfata (F6P) z ATP. Tvorita se fruktoza-1,6-bisfosfat (F1,6P₂) in ADP. Dolgo je veljalo prepričanje, da je PFK ključni regulatorni encim glikolize, glede na veliko število alosteričnih efektorjev (Flores in sod., 2000). Njena aktivnost je odvisna od dostopnosti sladkorjev. Narašča kot posledica naraščajočih koncentracij njenega substrata F6P in alosteričnega aktivatorja fruktoza-2,6-bisfosfata (F2,6P₂). Aktivnost PFK je regulirana preko aktivacije s F1,6P₂, Pi, AMP, inhibicije z ATP in preko drugih dejavnikov (ADP, NH⁴⁺, citrat) (Teusink in sod., 2000). V kvasovki *S. cerevisiae* takoj po dodatku glukoze v gojišče aktivnost PFK naraste zaradi naraščajoče koncentracije substrata F6P in alosteričnega aktivatorja F2,6P₂. Posledica aktivnosti PFK je porast koncentracije njenega produkta F1,6P₂. Slednji deluje kot alosterični aktivator piruvat kinaze. Tako se močno poveča tok intermediatov skozi glikolizo, posledično pride do povečanja koncentracije celičnega ATP (Goncalves in Planta, 1998). Inhibitorno delovanje ATP je bolj izrazito na PFK kot na HXK. Inhibicija PFK zaradi prevelike količine ATP povzroči manjšo porabo G6P, posledica je manjša tvorba produkta PFK (F1,6P₂), zato pride do kopičenja substrata PFK (F6P) (Larsson in sod., 2000). Ugotovili so, da PFK nima velike vloge v kontroli glikolitičnega toka ampak ga kontrolira sam sistem vnosa glukoze (Goncalves in Planta, 1998).

2.3.3.4 Nivo piruvat kinaze

Zadnjo ireverzibilno reakcijo glikolize katalizira piruvat kinaza (PYK). Katalizira prenos fosfatne skupine iz PEP na ADP, nastaneta piruvat in ATP. Aktivnost PYK uravnava alosterični aktivator F1,6P₂ (Wurster in sod., 1975; Jurica in sod., 1998), ki je produkt PFK. Aktivnost PYK je uravnavana še na nivoju substrata PEP, majhne količine le-tega aktivirajo PYK. Najpomembnejši aktivator encima je ATP, ki le v zelo visokih koncentracijah deluje inhibitorno na njeno delovanje. Na aktivnost PYK ne vpliva njen produkt – piruvat, saj je pri visokih koncentracijah ATP v celici količina piruvata nizka (Larsson in sod., 2000). Aktivnost PYK ima ključno vlogo pri kontroli količine ATP in drugih metabolitov glikolize v kvasovki (Jurica in sod., 1998).

2.4 ENOLOŠKA FERMENTACIJA

Alkoholna fermentacija je ena izmed glavnih faz v proizvodnji vina. Največkrat jo vršijo kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Industrijski sevi *S. cerevisiae* so visoko specializirani organizmi, ki so se prilagodili različnim okoljem oziroma različnim ekološkim nišam (Martini, 2003). Tako so se kvasovke med alkoholno fermentacijo v procesu "domestifikacije" adaptirale na različne vrste stresnih stanj. To so jim omogočili različni prilagoditveni mehanizmi (Querol in sod., 2003).

2.4.1 Tradicionalna fermentacija vina

Spontana fermentacija vina je kompleksen ekološki in biokemijski proces. Pri njem se zaporedno pojavljajo različne vrste kvasovk. Apikulatna kvasovka *Hanseniaspora uvarum* oziroma njena anamorfna oblika *Kloackera apiculata* in oksidativne kvasovke (npr. *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* in *Kluyveromyces*) so dominantne kvasovke na grozdju. Te ne-*Saccharomyces* kvasovke rastejo dobro med prvimi stopnjami fermentacije, v kasnejših stopnjah pa jih nadomestijo kvasovke iz rodu *Saccharomyces*, ki so bolj tolerantne na etanol (Fleet in Heard, 1992). Čeprav so v moštu prisotne kvasovke iz različnih rodov pa so za alkoholno fermentacijo odgovorne kvasovke iz rodu *Saccharomyces*, predvsem vrsta *Saccharomyces cerevisiae*. Vir ne-*Saccharomyces* kvasovk je koža grozdja in vinarska oprema. Izvor *S. cerevisiae* pa je vprašljiv. Ugotovili so, da *S. cerevisiae* praktično ni na grozdju in ne v zemlji vinograda. Nekateri avtorji domnevajo, da je *S. cerevisiae* "udomačena" vrsta, ki izhaja iz njenega bližnjega sorodnika, divje kvasovke *Saccharomyces paradoxus*. Slednjo najdemo po vsem svetu v asociaciji z insekti, v eksudatih dreves in fermentirajočih rastlinskih ekstraktih (Naumov, 1996).

Tradicionalen pristop proizvodnje vina je danes v veliki meri nadomestil proces alkoholne fermentacije s selekcioniranimi kulturami *Saccharomyces cerevisiae*. Gre za hitre, konsistentne fermentacije pri katerih se za inokulacijo mošta uporabljajo starterske kulture določenega vinskega seva kvasovke *S. cerevisiae* (Casal in Schuller, 2005).

2.4.2 Kinetika rasti kvasovk med alkoholno fermentacijo

Tipična fermentacija grozdnega soka je anaeroben proces. Molekularni kisik, ki je prisoten na začetku, se hitro porabi. Med fermentacijo viabilna populacija kvasovk v moštu naraste od začetnih vrednosti 10^4 – 10^6 CFU/ml na 10^8 – 10^9 CFU/ml. Gre za tipično rast mikroorganizmov v zaprtem sistemu. Faze rasti si sledijo: faza prilagajanja (lag faza), eksponentna faza, stacionarna faza in faza odmiranja. Kinetika rasti v posamezni fazi alkoholne fermentacije je odvisna od različnih faktorjev, med drugim od bistrenja grozdnega soka, dodatka SO_2 , temperature fermentacije, sestave mošta, inokulacije s selekcioniranimi kvasovkami in tudi od interakcij z drugimi mikroorganizmi, ko gre za tradicionalno fermentacijo (Fleet in Heard, 1992). Rast lahko spremljamo z različnimi metodami npr. s štetjem živih celic, z določanjem suhe teže kvasovk, s štetjem celokupnega števila celic pod mikroskopom, s spremljanjem produkcije CO_2 , etanola in porabe sladkorjev. Prenehanje celične rasti ne pomeni, da so celice prenehale biti metabolno aktivne. Celice, ki so dosegle stacionarno fazo rasti in se ne delijo, so do neke mere še vedno metabolno aktivne. Dokaz je poraba fermentabilnih sladkorjev iz medija in produkcija CO_2 in etanola (Boulton in sod., 1996). Velika količina etanola nastane v stacionarni fazi rasti, to pomeni, da se veliko sladkorja metabolizira v odsotnosti celične rasti. Sladkor se v tej fazi porablja samo kot vir energije in ne kot vir ogljika za nastanek kvasne biomase. V tej stopnji nastane tudi veliko sekundarnih končnih produktov fermentacije (acetaldehid, estri, višji alkoholi, polioli, organske kisline), ki so pomembni, saj določajo organoleptične lastnosti končnega produkta. Eksponentna faza je relativno kratka in traja le par dni (Bisson, 1992).

2.4.3 Stresni dejavniki, ki vplivajo na rast kvasovk med fermentacijo

Stresni pogoj je katerikoli okoljski faktor, ki vpliva na rast kvasovk. Stresni pogoji med fermentacijo zmanjšajo hitrost rasti in stopnjo preživetja kvasovk, zato zmanjšajo učinkovitost fermentacije. Originalen genom *S. cerevisiae* je bil tekom evolucije podvržen velikim selektivnim pritiskom med alkoholno fermentacijo mošta. Kvasovka se je tako prilagodila na specifično okolje. Med namnoževanjem biomase in proizvodnjo alkohola so celice podvržene različnim stresom. Gre za osmotski stres zaradi visoke koncentracije sladkorjev v moštu in etanola, ki nastane med fermentacijo. Stresni dejavniki so tudi protimikrobne spojine (npr. žveplov dioksid) (Querol in sod., 2003).

Pogoji med fermentacijo v nekaterih primerih postanejo suboptimalni in kvasovke lahko prenehajo fermentirati. To se zgodi, ko je v moštu premalo vira dušika oziroma le-ta vsebuje prevelike koncentracije sladkorjev. Pri tem pride do upada živosti kvasne populacije (Ivorra in sod., 1999).

Količina dostopnega dušika je odvisna od količine dostopnih asimilabilnih virov dušika v moštu. Premajhna količina le-tega negativno deluje na rast kvasovk. Prisotnost etanola v mediju še zmanjša vnos dušika v celice kvasovk. Poleg omejenosti z virom dušika, lahko med alkoholno fermentacijo pride tudi do pomanjkanja sladkorjev proti koncu procesa. (Ivorra in sod., 1999). V industrijskih fermentacijah vina temperaturo uravnava, zato ta največkrat ne predstavlja stresnega dejavnika za rast kvasovk.

Kvasovke so razvile različne poti, ki jim omogočajo zaznavo in molekularni ter fiziološki odgovor na stresne pogoje v okolju (angl. "stress response"). Pri regulaciji stresnega odgovora sodelujejo senzorski sistemi in poti prenosa signala. Posledica prenosa le-tega je aktivacija genov, ki se odzivajo na stres. Gre za gene, ki kodirajo HSP proteine (angl. Heat Shock Proteins) in gene iz drugih genskih družin. Carrasco in sod. (2001) so ugotovili, da so komercialno uporabljene vinske kvasovke bolj odporne na različne stresne pogoje med fermentacijo kot pa laboratorijski sevi.

2.4.3.1 Osmotski stres in tvorba glicerola

Saccharomyces cerevisiae je saharofilna kvasovka. V svojem naravnem okolju je izpostavljena visokim koncentracijam sladkorjev. Pri proizvodnji desertnih vin sladkorji dosežajo koncentracije do 50 % (w/v). Pod takimi pogoji fermentacije pride do spremembe v ekspresiji mnogih genov. Sladkorni stres regulira izražanje več kot 500 genov (Perez-Ortin in sod., 2002; del Olmo in Zuzuarregui, 2004). Poveča se ekspresija glikolitičnih genov in genov, ki so vpleteni v pot pentoze fosfata. Pot pentoze fosfata najbrž služi kot ponor G6P in F6P iz poti glikolize. Poviša se tudi ekspresija genov odgovornih za sintezo očetne kisline iz acetaldehida in genov za sintezo sukcinata iz glutamata. Pride še do negativne regulacije genov vpletenih v biosintezo celičnih komponent (Erasmus in sod., 2003).

Osmoregulatoren odziv v *S. cerevisiae* je dobro proučen. Celično rast, shranjevanje vira ogljika in stresni odziv regulirata HOG pot in RAS-cAMP pot (Mager in Siderius, 2002; Yamaji in sod., 2003; Park in sod., 2005).

Posledica izpostavitve kvasovk hipertoničnemu mediju je masovno izhajanje vode iz celic v medij. Proces poganjajo različne vodne aktivnosti v celici in v okolju. Osmoregulacija je celični odziv, ki ohranja celični volumen, turgorski pritisk in biološke aktivnosti celice (Tamas in sod., 2000). Mikroorganizmi med rastjo v mediju z zmanjšano vodno aktivnostjo s povečano znotrajcelično akumulacijo enega ali več topljencev preprečujejo iztok vodnih molekul iz celice. Ti znotrajcelični topljenci se akumulirajo v povečanih koncentracijah in ne povzročijo inhibicije oziroma inaktivacije aktivnosti encimov v celici. Tako se celični procesi lahko nadaljujejo kljub nizki intracelularni vodni aktivnosti. Splošno kompatibilne topljence uvrščamo med ione, amino kisline in polihidroksi spojine. Kvasovke najpogosteje sintetizirajo glicerol (Nevoigt in Stahl, 1997).

S. cerevisiae se na povišan osmotski stres prilagodi s povišano tvorbo glicerola, ki je glavni kompatibilni znotrajcelični topljenec (Rep in sod., 2000). Glicerol je kemijsko 1,2,3-propantriol prozorne barve, brez vonja, je močno higroskopičen in ima sladek okus. Akumulacija glicerola se začne takoj ob izpostavitvi kvasovk hiperosmotičnemu mediju, a visoko intracelularno koncentracijo doseže šele po več urah. V vinarstvu je glicerol zaželen produkt, saj daje vinu polnost okusa (Ozbas in Yalcin, 2004).

Glicerol je eden izmed stranskih produktov fermentacije mošta. Nastaja kot stresni odgovor pri osmotskem stresu, v anaerobnih razmerah je potreben tudi za reoksidacijo NADH v NAD⁺. Ključni korak sinteze glicerola katalizira encim glicerol-3-fosfat dehidrogenaza (GPD), ki konvertira dihidroksiacetone fosfat (DHAP) v glicerol-3-fosfat. Pri tem nastaja NAD⁺ (Ivorra in sod., 1999). Tako je sinteza glicerola pod anaerobnimi pogoji drugi način regeneracije NAD⁺. To funkcijo opravlja tudi encim alkohol dehidrogenaza. Nastanek glicerola na ta način vzdržuje redoks ravnotežja v citosolu (Ozbas in Yalcin, 2004). Povišanje tvorbe glicerola je posledica povečanja koncentracije NADH v citoplazmi. Slednja je posledica zmanjšane redukcije acetaldehida v etanol oziroma njegove povečane oksidacije v očetno kislino. Tako pod pogoji osmotskega stresa tudi proizvodnja acetata igra pomembno vlogo pri vzdrževanju redoks ravnotežja v kvasni celici (Erasmus in sod., 2003).

Po izpostavitvi osmotskemu šoku se spremeni tudi aktivnost različnih glikolitičnih encimov. Ekspresija genov, ki kodirajo heksokinazni transporter (HXT1) in glukokinazo (GLK1), je močno inducirana v pogojih osmotskega stresa. Povečan vnos glukoze med osmotskim stresom je možen vir gradnikov za nastanek glicerola (Nevoigt in Stahl, 1997; Taherzadeh in sod., 2002).

Osmotski stres ima pomembno vlogo pri biosintezi glicerola v gojiščih z začetnimi koncentracijami fruktoze nad 100 g/l. Ozbas in Yalcin (2004) sta ugotovila, da kvasovke rastejo počasneje v mediju s fruktozo, pri tem pa imajo večjo specifično hitrost proizvodnje glicerola oziroma producirajo višje koncentracije glicerola. Minimalna a_w (vodna aktivnost) za *S. cerevisiae*, ko je topljenec glukoza, je 0,89 in 0,91, ko je topljenec

fruktoza. Ker kvasovke potrebujejo višjo a_w vrednost za rast v gojišču s fruktozo, sta avtorja predlagala, da to oblikuje pogoje, ki suprimirajo rast celic, a inducirajo tvorbo glicerola zaradi osmotskega stresa.

2.4.3.2 Etanol

Proti koncu fermentacije se poveča koncentracija etanola, ki povzroča t.i. vodni stres v kvasovkah (Ivorra in sod., 1999). Inhibitorni vpliv etanola, ki nastane med fermentacijo s *S. cerevisiae*, je lahko vzrok za upočasnjeno oziroma zaustavljeno enološko fermentacijo. Etanol zmanjša hitrost rasti kvasovk, njihovo viabilnost in zmožnost fermentacije (Bai in sod., 2003).

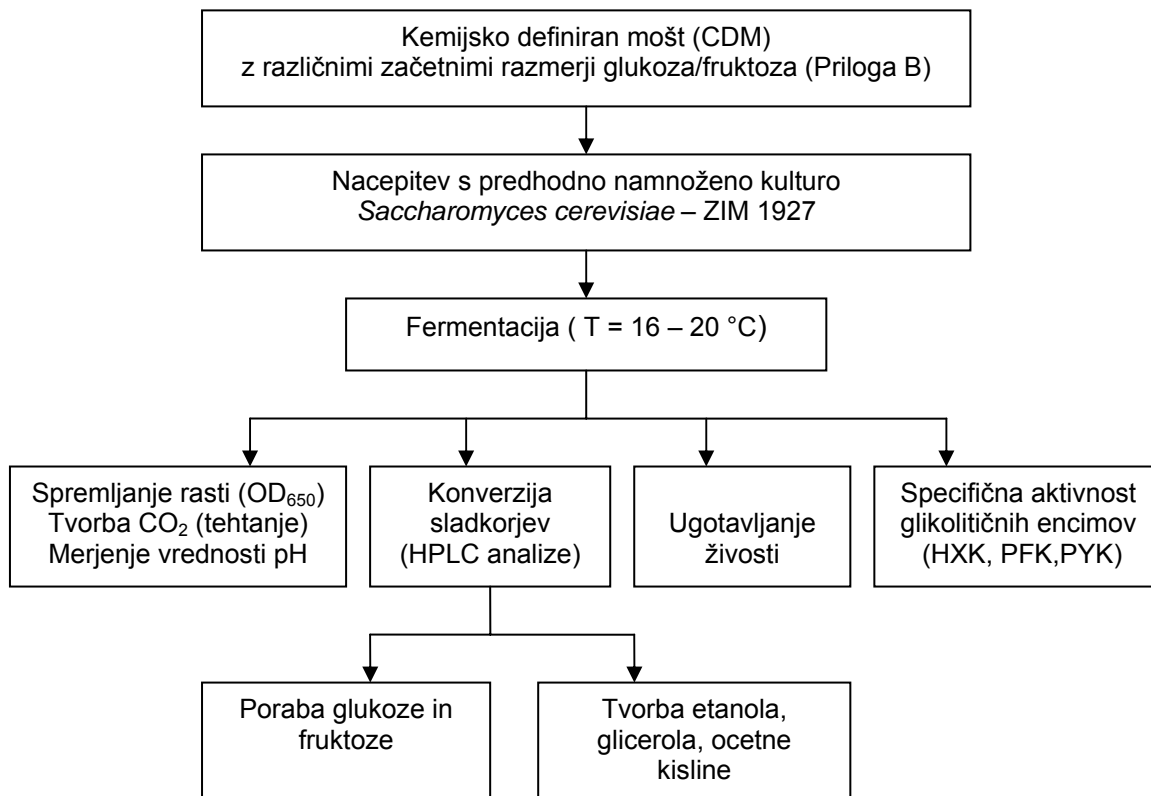
Glavna tarča delovanja etanola je plazemska membrana. Etanolni stres spremeni njeno organizacijo in permeabilnost. Primarne tarče toksičnosti etanola so lipidi v plazemski membrani. S spremembo mikrookolja v membrani etanol indirektno inhibira aktivnost različnih transportnih sistemov. Zato morajo proteini heksoznega transporta učinkovito delovati v spreminjajočem se mikrookolju (Bisson, 1993). Etanol vpliva na vdor vodikovih protonov v celico in posledično stimulira aktivnost membranske H^+ -ATPaze. Ta mora stalno delovati, da vzdržuje vrednost pH na fiziološki ravni celice. Etanol tudi zmanjšuje asimilacijo dušikovih komponent.

Zaradi povišane koncentracije etanola v mediju proti koncu fermentacije se zmanjša aktivnost posameznih heksoznih prenašalcev kot posledica nekompetitivne inhibicije z etanolom, ki nastaja med alkoholno fermentacijo. Vendar po izpostavitvi celic etanolu te postanejo nanj manj občutljive, adaptirajo se na stresni dejavnik. Etanol sproži stresni odziv v *S. cerevisiae*. Med 4 - 6 % (v/v) sproži nastanek HSP proteinov. Med fermentacijo vina večino etanola proizvedejo celice v stacionarni fazi rasti (Ansanay-Galeote in sod., 2001).

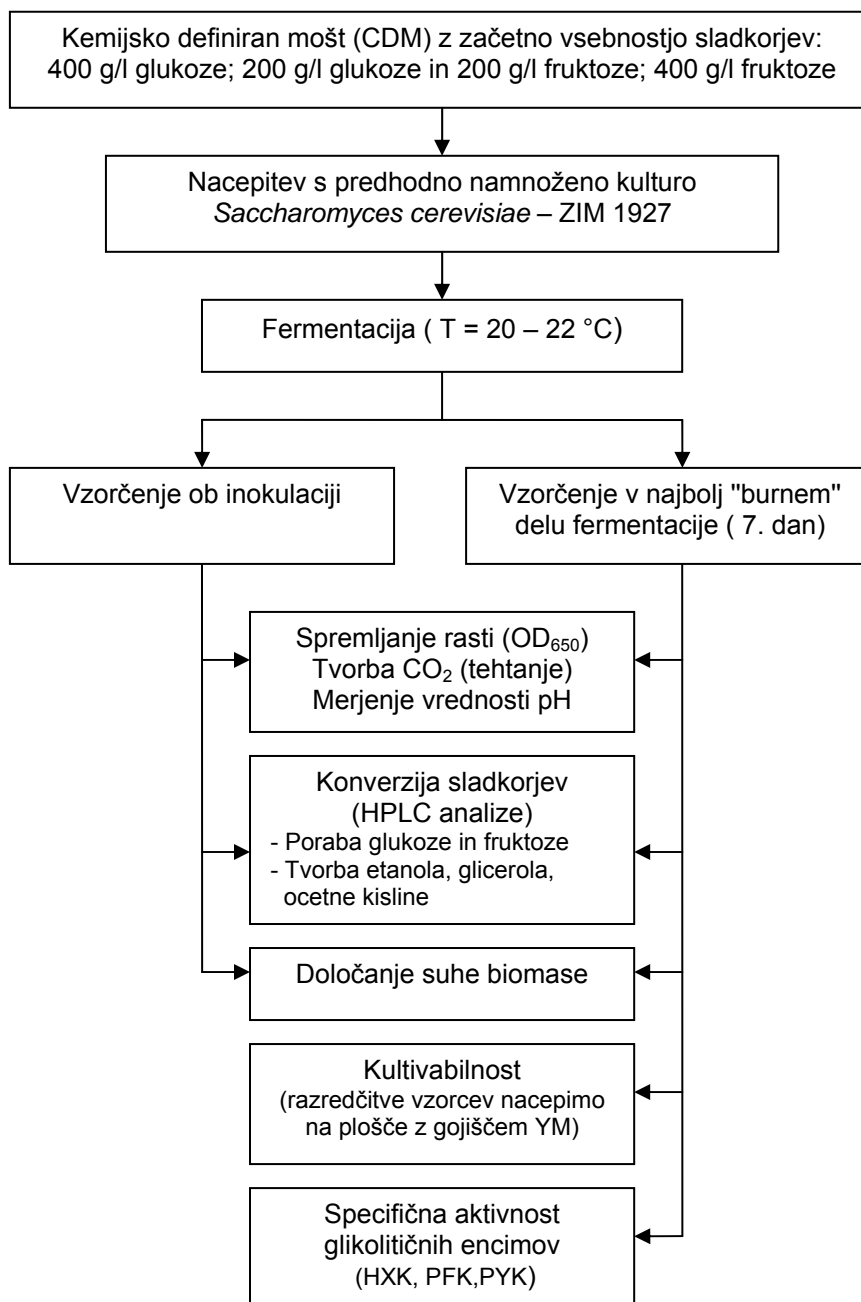
Etanol različno vpliva na porabo glukoze in fruktoze med fermentacijo. Poraba fruktoze je močnejše inhibirana pod pogoji, ko so v mediju visoke koncentracije etanola, kot pa je inhibirana poraba glukoze (Berthels in sod., 2004). Sistem porabe glukoze izgleda bolj robusten pod pogoji visokega etanolnega stresa. To podpira domnevo, da je reducirana fermentacija fruktoze mogoče glavni vzrok za upočasnjene oziroma zaustavljene fermentacije. Posledica občutljivosti fermentacije fruktoze na povišane koncentracije etanola je možen razlog za visoke koncentracije fruktoze v vinu po končani fermentaciji. Ni čisto jasno, zakaj etanol bolj inhibira porabo fruktoze. Opisali so, da etanol vpliva na kapaciteto ne pa na afiniteto transportnega sistema za glukozo (Berthels s sod., 2004). Etanol tudi povzroči premik tautamerne ravnotežja iz fruktopiranozne v fruktofuranozno obliko, to lahko še zniža afiniteto transporterjev za fruktozo.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 2: Shematski prikaz poteka prvega dela poskusa



Slika 3: Shematski prikaz poteka drugega dela poskusa

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizem

Pri našem delu smo uporabili kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 1927) iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM). Zbirka ZIM je last Laboratorija za industrijske kulture na Katedri za biotehnologijo, Oddelku za živilstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Po revitalizaciji smo kvasovko hranili na agarnih ploščah z gojiščem YM v inkubatorju pri 28 °C. Vitalnost kvasovke smo ohranjali s precepljanjem kulture na sveže gojišče YM vsake tri dni.

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 A1. Predhodno smo pripravili založne raztopine mineralov in vitaminov (Priloge A2 in A3). Založne raztopine mineralov smo sterilizirali s filtracijo (premer por filtra 0,20 µm). Založno raztopino vitaminov pa smo filtrirali preko filtra z velikostjo por 0,45 µm. Hranili smo jih v hladilniku. Pet gojišč z različnim razmerjem glukoze in fruktoze, ki smo jih pripravili v treh ponovitvah (trije fermentorji s po en liter gojišča CDM), je podanih v Prilogi B. Gojišča smo po raztapljanju sladkorjev sterilizirali s filtracijo preko nitroceluloznih filtrov s premerom por 0,45 µm. pH vrednosti gojišč smo pred sterilizacijo uravnali na 3,5 z dodajanjem 1M HCl.

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

YM (Yeast extract - Malt extract) gojišče smo uporabili za precepljanje kvasovke in za določanje števila kolonijaskih enot iz brozge (= kultivabilnosti) kvasovk.

gojišče YM (g/l 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 15 min pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar.

3.2.3 Raztopine

3.2.3.1 Fiziološka raztopina

Uporabili smo jo pri določanju živosti celic za razredčevanje po Kochu.

Priprava založne fiziološke raztopine:

KH_2PO_4	3,4g
NaOH	1 ali 3 M

KH_2PO_4 smo raztopili v 500 ml čaši z destilirano vodo in jo nevtralizirali z NaOH do vrednosti pH 7,2. Raztopino v merilni bučki smo dopolnili z destilirano vodo do oznake 1000 ml. Koncentrat za fiziološko raztopino hranimo v hladilniku in ga redčimo pred uporabo v razmerju 1,25: 1000 ml destilirane vode. Sledi sterilizacija v avtoklavu (121 °C / 1,2 bar / 20 min).

3.2.3.2 Metilensko modrilo

Raztopili smo 0,01 g metilenskega modrila v 10 ml destilirane vode. Nato smo dodali 2 g natrijevega citrata dihidrata in raztopili. Sledila je filtracija in dodatek destilirane vode do 100 ml (Kirsop in Painting, 1989).

3.2.4 Reagenti

Pri našem delu smo poleg reagentov za gojišča uporabljali še številne druge reagente. Raztopine so bile pripravljene v destilirani vodi.

- ADP (95-99 %, Sigma)
- ATP (min. 99 %, Sigma)
- BSA (100 %, Sigma)
- Bradfordov reagent (BioRad)
- CompleteTM Mini inhibitor proteaz (Roche)
- fosfoenolpiruvat (min. 98 %, Sigma)
- fruktoza (Merck)
- fruktoza-1,6-bisfosfat (99 %, Calbiochem)
- fruktoza-1,6-bisfosfat aldolaza (Sigma)
- glukoza (p.a., Kemika)
- glicerol-3-fosfat-dehidrogenaza (Sigma)
- glukoza-6-fosfat (100 %, Sigma)
- HCl (32 %, Merck)
- imidazol-HCl pufer (p.a., Merck)
- KH_2PO_4 (p.a., Merck)
- K_2HPO_4 (p.a., Merck)
- kakodilna kislina-NaOH pufer (min. 98 %, Sigma)

- NaCl (p.a., Merck)
- NADH (min. 98 %, Sigma)
- NADP⁺ (min. 98, Sigma)
- NaOH (p.a., Merck)
- pufri za umerjanje pH-metra: pH 4,01; 7,0 in 9,21 (Mettler Toledo)
- triozafosfat-izomeraza (Sigma)
- mobilna faza za HPLC: H₂SO₄ (p.a., min. 96,0 %, Carlo Erba)

3.2.5 Oprema in aparature

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

- avtoklav (Sutjeska)
- brezprašna komora (Iskra PIO SMBC 122)
- centrifuge (Tehtnica Železniki LC-321, Sigma 3K30)
- inkubator (Sutjeska)
- magnetno mešalo (Tehtnica Železniki)
- mikroskop (Leica ATC 2000)
- pH-meter (Mettler Toledo)
- števne ploščice Bürker-Türk (Brand)
- programska oprema za nadzor spektrofotometra Pharmacia: Swift-Reaction Kinetics, 1.01
- rotacijski stresalnik (Mrzel)
- sistem za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Knauer)
- spektrofotometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000)
- sušilnik (Sutjeska)
- tehtnici Sartorius-excellence in Sartorius-analytic
- vrtničnik (Tehtnica Železniki VIBROMIX 104 EV)
- vodna kopel (HETO)
- zamrzovalna omara (HETO Ultra Freeze, – 80 °C)
- filtrirna naprava (Sartorius in nitrocelulozni filtri Sartorius, velikost por 0,45 µm, Sartorius)

3.3 METODE

3.3.1 Gojitvene metode

3.3.1.1 Metoda namnožitve biomase za vcepek

Tekoči vcepek za fermentacijo smo pripravili v 500 ml erlenmajericah s stransko kiveto, ki so vsebovale 250 ml gojišča CDM z vsebnostjo sladkorjev 10 g/l (5 g/l glukoze in 5 g/l fruktoze). Iz agarnih plošč z gojiščem YM smo s cepilno zanko v CDM gojišče prenesli dva dni staro kulturo *S. cerevisiae* – ZIM 1927, da smo dosegli optično gostoto (OD) približno 0,20 pri valovni dolžini 650 nm. Kvasovke smo na rotacijskem stresalniku z 200 vrt./min pri sobni temperaturi 28 °C namnoževali do stacionarne faze rasti. Ta je nastopila, ko je substrat z biomaso dosegel vrednost optične gostote OD₆₅₀ med 1,4 in 1,6. Tako smo dobili celice v dovolj veliki koncentraciji za nadaljni potek poskusa. Namnožene kulture kvasovk smo desetkrat razredčili s fiziološko raztopino in pod mikroskopom s pomočjo Bürker-Türkova hemocitometra (Brand) določili število celic v mililitru gojišča. Glede na zahtevo, da mora biti v moštu začetna koncentracija kvasovk približno $1 \cdot 10^5$ CFU/ml, smo preračunali potreben volumen gojišča s kvasovkami (Povhe Jemec, 2003). Tako pripravljen vcepek smo porazdelili po sterilnih 2 l fermentorjih z delovnim volumnom 1 l, ki so vsebovali gojišča CDM z različnim razmerjem sladkorjev glukoze in fruktoze.

3.3.1.2 Anaeroben šaržni bioproces (Alkoholna fermentacija)

Fermentacija je potekala 42 dni pri temperaturi 16 – 20 °C v petnajstih fermentorjih z delovnim volumnom 1 liter. Začetna koncentracija sladkorja v kemijsko definiranem moštu je bila približno 400 g/l. Gojišča so se razlikovala glede na razmerje glukoze in fruktoze. Na fermentorje smo pred inokulacijo namestili vrelne vehe, za odvajanje CO₂, ki je nastajal med fermentacijo. Vzorčili smo vsak 3. – 4. dan po 2 ml vzorca iz posameznega fermentorja. Vzorcju smo izmerili vrednosti pH, OD₆₅₀ ter filtrirani vzorec (premer por filtra 0,45 µm) analizirali s HPLC. Fermentorje smo tudi tehtali pred in po vzorčenju, to nam je omogočilo izračun tvorbe CO₂. V drugem delu poskusa smo izvedli enake analize kot v prvem, le da smo imeli le 9 fermentorjev (Priloga B). Vzorčili smo ob inokulaciji in po sedmih dneh fermentacije.

3.3.2 Analitične metode

3.3.2.1 Merjenje prirasta biomase z merjenjem optične gostote brozge (Raspor in sod., 2003).

Pri namnoževanju vcepka na stresalniku v erlenmajericah s stransko kiveto smo rast kvasovk spremljali z merjenjem intenzitete prepuščene svetlobe v fotometru pri valovni dolžini 650 nm, kar smo izrazili kot optično gostoto (OD₆₅₀). Podobno smo spremljali tudi rast kvasovk med fermentacijo, kjer smo OD₆₅₀ brozge izmerili v vzorčkih.

3.3.2.2 Merjenje vrednosti pH

Za merjenje vrednosti pH smo uporabili pH-meter Mettler Toledo, ki smo ga umerili v treh točkah s pufri vrednosti pH 4,01; 7,0 in 9,21.

3.3.2.3 Spremljanje tvorbe CO₂ (Bely in sod., 2003)

Med fermentacijo smo spremljali sproščanje CO₂. Količino sproščenega CO₂ smo določili z merjenjem izgube teže fermentorjev pred posameznim vzorčenjem.

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

Koncentracijo glukoze, fruktoze, etanola, glicerola in očetne kisline smo določali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (Luparia in sod., 2004). Uporabili smo termostatorirano kolono Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm, Bio Rad), ki je bila izprana s 5 mM raztopino H₂SO₄. Na koloni so se metaboliti ločevali na osnovi treh načel: ionske izmenjave, velikosti molekul in naboja. Z detektorjem RI (detektor na osnovi lomnih količnikov raztopin) smo določili glukozo, fruktozo, glicerol in etanol, očetno kislino pa z UV detektorjem. Za kalibracijo analitskega postopka smo uporabili metodo zunanjih standardov; površina pika določenega standarda je bila mera za koncentracijo. Standardne raztopine smo pripravili z raztapljanjem glukoze, fruktoze, etanola, glicerola in očetne kisline v bidestilirani vodi v koncentracijskem območju kot so znašale koncentracije v KD (= kemijsko definiranem) moštu. Pri kvalitativnem določanju smo uporabili vodno raztopino posameznega standarda in tako dobili čase zadrževanja na koloni. Zadrževalni časi na koloni Aminex so podani v prilogi D. Rezultate smo izrazili kot g/l brozge.

3.3.2.5 Določanje skupnega števila kvasovk in njihove živosti

Na Bürker-Türk-ov hemocitometer smo dali kapljico v fiziološki raztopini razredčene suspenzije kvasovk in pod mikroskopom prešteli število celic, ki smo jih izrazili kot skupno število celic/ml. Po končani fermentaciji smo vzorce tudi obarvali z barvilom metilenskomodrilo. Zmešali smo enaka volumna barvila in vzorca fermentacijske brozge. Obarvane suspenzije celic smo pod mikroskopom prešteli na Bürker-Türk-ov-em hemocitometru. Izrazili smo odstotek živih celic. Modre celice predstavljajo mrtve celice. Kvasne celice, ki so metabolno aktivne pa vsebujejo encim, ki razgradi barvilo, ki difundira v celice, in so zato prosojne (Kirsop in Painting, 1989).

Izračun skupnega števila kvasovk:

$$\text{št. vseh celic / ml} = X \cdot R \cdot f \quad \dots(4)$$

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

Vzorci smo v fiziološki raztopini ustrezno desetiško razredčili in 0,1 ml ustrezno redčenega vzorca nacepili na agarne plošče z YM gojiščem. Vsako razredčitev smo nacepili v paralelki. Iz vsake žive celice, ki je zmožna reprodukcije, zraste kolonija. Po končani inkubaciji pri 28 °C smo prešteli število kolonij na ploščah. Rezultat smo podali kot število kolonijskih enot/ml oziroma CFU (Colony Forming Unit)/ml (McMeeken in sod., 1993).

Izračun števila kolonijskih enot:

$$\text{Št. KE / ml} = \frac{Y \cdot R}{V} \quad \dots(5)$$

Y - število kolonijskih enot prešteti na plošči; R - faktor redčitve brozge; V - volumen, ki smo ga razmazali na plošče

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

Vzorec (8 ml) brozge smo odpipetirali v stehtano centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 4000 vrt./min. Usedlino oziroma sedimentirano biomaso smo dvakrat sprali z 0,015 M KH₂PO₄ (fosfatnim) pufrom (pH 4). Po končanem centrifugiranju smo suho biomaso sušili pri temperaturi 105 °C do konstantne mase. Stehtani suhi biomas v centrifugirkah smo odšteli maso praznih centrifugirk in tako dobili maso suhe biomase. 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 bioprosesne brozge, da smo dobili 1 g mokre biomase. Biomaso smo dvakrat sprali z 20 mM 0,015 fosfatnega pufra KH₂PO₄ (pH 4). Vzorcju biomase smo dodali 5 ml 50 mM fosfatnega pufra (pH 7) z inhibitorjem proteaz (Roche) in 5 g sterilnih steklenih kroglic s premerom 0,5 mm (razmerje biomasa: pufer: kroglice = 1 : 5 : 5) ter vzorce postavili na led. Celice v vzorcju smo razbili z mešanjem na vibracijskem mešalniku štirikrat po 1 minuto z vmesnim hlajenjem na ledu. Nepoškodovane celice, ostanke celic in steklene kroglice smo odstranili s centrifugiranjem na 20000 × 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 smo pripravili tako, da smo 50 mM pufra K₂HPO₄ dodajali 50 mM pufer KH₂PO₄ do vrednosti pH 7.

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

V vzorcih celičnih ekstraktov smo določili topne proteine po Bradfordu. Metoda temelji na dejstvu, da se barvilo Comassie brilliant modro G-250 veže na proteine. Pri tem se rdeča barva barvila spremeni v modro, s tem pa se premakne absorpcijski maksimum barvila s 465 na 595 nm. Vezava barvila je zelo hitra in tvori zelo stabilen kompleks protein-barvilo (1 h).

Zamrznjen ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) celični ekstrakt smo odtalili v vodni kopeli s temperaturo $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. V centrifugirke smo odpipetirali $50\text{ }\mu\text{l}$ celičnega ekstrakta, dodali $2,5\text{ ml}$ razredčenega Bradfordovega reagenta ($5\times$ razredčen Bradfordov koncentrat), premešali in po 5 min izmerili absorbanco vzorca pri 595 nm . Pri slepem vzorcu smo namesto vzorca celičnega ekstrakta uporabili $50\text{ }\mu\text{l}$ $0,15\text{ M NaCl}$. Iz umeritvene krivulje (Priloga C) smo izračunali količino topnih proteinov v celičnem ekstraktu:

$$A_{595} = 0,0106 \cdot \text{masa proteinov} + 0,0372 \quad \dots(6)$$

Rezultat smo izrazili kot mg topnih proteinov na ml celičnega ekstrakta. Za umeritveno krivuljo smo uporabili znane koncentracije BSA. Koncentracijo proteinov v mokri biomasi smo izračunali tako, da smo mg topnih proteinov/ml celičnega ekstrakta pomnožili z volumnom pufra ter delili s količino mokre biomase, ki smo jo uporabili za pripravo celičnega ekstrakta.

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 (Unit = U) je definirana kot količina encima, ki oksidira (reducira) $1\text{ }\mu\text{mol}$ substrata v 1 min . Aktivnosti 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 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 340 nm . Ekstinkcijski koeficient ($\epsilon_{340\text{nm}}$) reduciranih piridinskih dinukleotidnih koencimov NAD(P)H znaša $6,22 \cdot 10^3\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (de Jong-Gubbels in sod., 1995). Aktivnost encimov je program izračunal na podlagi Beer-Lambertov-ega zakona:

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

A - absorbanca; I_0 in I intenziteta vhodne in izhodne svetlobe; c - koncentracija vzorca oziroma substrata (M); l - dolžina poti žarka skozi vzorec v centimetrih (1 cm); ϵ - molarni ekstinkcijski koeficient ($\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)

Pri merjenju encimske aktivnosti merimo spremembo koncentracije vzorca substrata s časom tako, da merimo spremembo absorbance v času:

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

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

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

V – volumen reakcijske mešanice (1 ml)

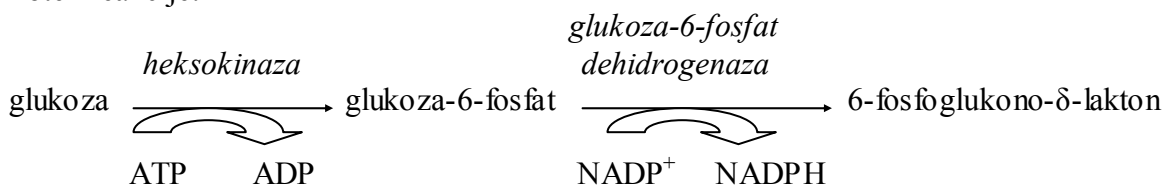
Pri meritvah smo v reakcijskih mešanicah uporabili tolikšen volumen celičnega ekstrakta, da je vseboval 100 µg topnih proteinov. Specifične aktivnosti encimov smo izrazili v U/mg topnih proteinov. Predhodno zamrznjene (– 80 °C) celične ekstrakte smo odtalili v vodni kopeli s temperaturo 25 °C. Tudi vsi pufri in reagenti so bili med potekom meritev ogrevani na 25 °C. Kot slep vzorec za posamezni encim smo uporabili vse reagente v reakcijski mešanici razen celičnega ekstrakta.

⇒ Določanje aktivnosti heksokinaze (Hxk) :

Aktivnost encima heksokinaze (EC 2.7.1.1, ATP/D-heksoza-6-fosfottransferaza) smo določili z modificirano metodo po Espinelu in sod. (1996). Uporabili smo naslednje pufre in reagente: 50 mM imidazolni pufer (pH 7.6), 250 mM MgCl₂, 250 mM glukoza, 40 mM NADP⁺, 100 U/ml glukoza-6-fosfat dehidrogenaza, 50 mM ATP.

Reakcijska mešanica (1 ml) je vsebovala: 50 mM imidazolnega pufra (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 25 mM glukoze, 1 mM NADP⁺, 0,1 U/µl glukoza-6-fosfat dehidrogenaze in celični ekstrakt. Za začetek encimske reakcije smo dodali 2 mM ATP.

Potek reakcije:

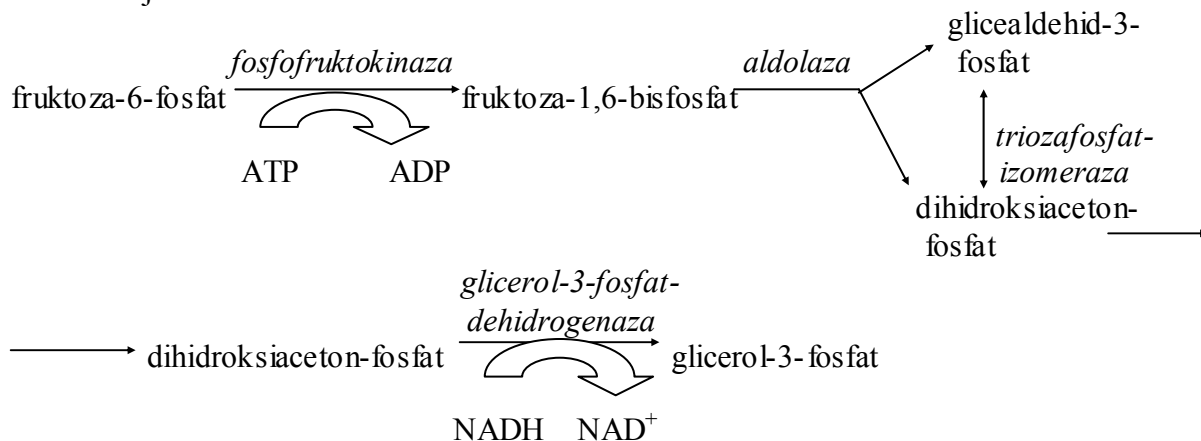


⇒ Določanje aktivnosti fosfofruktokinaze (Pfk) :

Aktivnost encima fosfofruktokinaze (EC 2.7.1.11, ATP/D-fruktozo-6-fosfat-1-fosfottransferaza) smo določili po metodi de Jong-Gubbels in sod. (1995). Uporabili smo naslednje pufre in reagente: 50 mM imidazolni-HCl pufer (pH 7,0), 64 mM (NH₄)₂SO₄,

250 mM MgCl₂, 15 mM NADH, 50 mM ATP, 100 U/ml fruktoza-1,6-bifosfat aldolaza, 100 U/ml glicerol-3-fosfat dehidrogenaza, 0.1 U/μl triozafosfat izomeraza, 25 mM fruktuza-6-fosfat. Reakcijska mešanica (1 ml) je vsebovala: 50 mM imidazolnega-HCl pufra (pH 7,0), 6,4 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 0,15 mM NADH, 0,5 U fruktoza-1,6-bifosfat aldolaze, 0,6 U glicerol-3-fosfat dehidrogenaze, 1,8 U triozafosfat izomeraze, 0,05 mM ATP in celični ekstrakt. Za začetek encimske reakcije smo mešanici dodali 0,25 mM fruktuza-6-fosfata.

Potek reakcije:

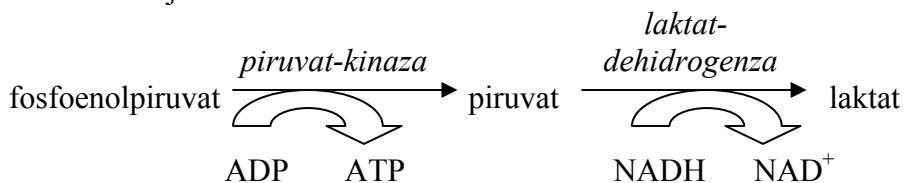


⇒ Določanje aktivnosti piruvat kinaze (Pyk)

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 kakodilna kislina-NaOH pufer (pH 6,2), 1 M KCl, 100 mM ADP, 10 mM fruktuza-1,6-bifosfat, 250 mM MgCl₂, 15 mM NADH, 1000 U/ml laktat dehidrogenaza, 100 mM fosfoenolpiruvat.

Reakcijska mešanica (1 ml) je vsebovala: 100 mM kakodilne kisline - NaOH pufra (pH 6,2), 100 mM KCl, 10 mM ADP, 1 mM fruktuza-1,6-bifosfata, 25 mM MgCl₂, 0,15 mM NADH, 11,25 U laktat dehidrogenaze in celični ekstrakt. Za začetek encimske reakcije smo mešanici dodali 2 mM fosfoenolpiruvat.

Potek reakcije:



3.3.3 Metode za obdelavo podatkov

Poskusi so bili izvedeni v več ponovitvah, zato smo dobljene rezultate statistično ovrednotili. Izračunali smo tudi določene parametre rasti, ki so nam v pomoč pri razlagi vpliva koncentracije fruktoze in glukoze na kvasno alkoholno fermentacijo.

3.3.3.1 Statistična obdelava rezultatov

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, t-test).

○ Povprečna vrednost

Alkoholno fermentacijo v medijih z različnimi razmerji sladkorjev smo izvajali v treh ponovitvah. Rezultate meritev (poraba glukoze in fruktoze, tvorba etanola, glicerola, očetne kisline, tvorba CO₂, spreminjanje vrednosti pH, določanja suhe biomase in števila celic) smo podali kot povprečno vrednost (Adamič, 1989).

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

\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).

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

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

○ T – test

T-test temelji na preiskovanju domneve o razliki med povprečjema dveh majhnih neodvisnih vzorcev (Adamič, 1989). Preizkus temelji na vzorčni porazdelitvi razlik dveh povprečij. Osnovna domneva trdi, da se povprečji obeh vzorcev značilno razlikujeta. Ničelna domneva pa trdi, da oba vzorca izvirata iz iste populacije in da ni resnične razlike med obema povprečjema oziroma da je morebitna razlika samo posledica naključja. To domnevo preverjamo z izračunom verjetnosti, da bi dobili tako razliko med povprečjema obeh vzorcev, kakršno bi v resnici dobili, če bi bila vzorca vzeta iz iste populacije. Če je ta

verjetnost dovolj majhna, torej manjša od stopnje tveganja, za katero smo se odločili, zavrnejo ničelno domnevo v korist osnovne domneve. Zgornje meje tveganja (p) pri katerih zavračamo ničelno domnevo so najpogosteje 0,05; 0,01 ali 0,001. Glede na te meje govorimo tudi o 5-, 1-, in 0,1-odstotni stopnji značilnosti rezultatov. Za naše rezultate smo uporabljali zgornjo mejo tveganja $p \leq 0,05$ tako, da lahko z več kot 95-odstotno verjetnostjo trdimo, da se povprečji obeh vzorcev statistično značilno razlikujeta.

3.3.3.2 Določitev ravninskih parametrov (Heijnen, 2001)

- Specifična hitrost porabe substrata

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

X_k - koncentracija suhe biomase v brozgi v danem trenutku (g/l); X_z - koncentracija suhe biomase ob inokulaciji (g/l); S_z - koncentracija sladkorja ob inokulaciji (g/l); S_k - koncentracija sladkorja v brozgi v danem trenutku (g/l); $t_{\text{kult.}}$ - čas kultivacije

- Specifična hitrost tvorbe etanola

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

E_z - koncentracija etanola v brozgi ob inokulaciji (g/l); E_k - koncentracija etanola v brozgi v danem trenutku (g/l)

- Specifična hitrost tvorbe glicerola

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

G_z - koncentracija glicerola v brozgi ob inokulaciji (g/l); G_k - koncentracija glicerola v brozgi v danem trenutku (g/l)

- Specifična hitrost tvorbe CO_2

$$q_{\text{CO}_2} \left(\frac{g \text{ CO}_2}{g \text{ SB/h}} \right) = \frac{\text{CO}_{2z} - \text{CO}_{2k}}{X_k - X_z} \div t_{\text{kult.}} \quad \dots(16)$$

CO_{2z} - količina sproščenega CO_2 ob inokulaciji; CO_{2k} - količina sproščenega CO_2 v danem trenutku

- Maksimalna specifična hitrost rasti

$$\mu_{\text{max}} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad \dots(17)$$

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

- Izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase
je dejansko razmerje med proizvedeno biomaso in porabljenim substratom v istem času.

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

X_k - koncentracija suhe biomase v brozgi v danem trenutku (g/l); X_z - koncentracija suhe biomase ob inokulaciji (g/l); S_z - koncentracija sladkorja ob inokulaciji (g/l); S_k - koncentracija sladkorja v brozgi v danem trenutku (g/l)

- Izkoristek vira ogljika za tvorbo etanola

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

E_k - koncentracija etanola v brozgi po času t (g/l); E_z - koncentracija etanola ob inokulaciji (g/l); S_z - koncentracija sladkorja ob inokulaciji (g/l); S_k - koncentracija sladkorja v brozgi po času t (g/l)

4 REZULTATI

Na podlagi delovne hipoteze, da višje koncentracije fruktoze inhibitorno delujejo na potek alkoholne fermentacije mošta s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 1927) ter posredno na zaustavitev fermentacije in posledično na povečano koncentracijo preostalih sladkorjev v končnem produktu fermentacije - vinu, smo skušali dokazati zaustavitev fermentacije ob povišani koncentraciji fruktoze v gojišču oziroma upočasnjeno porabo le-te.

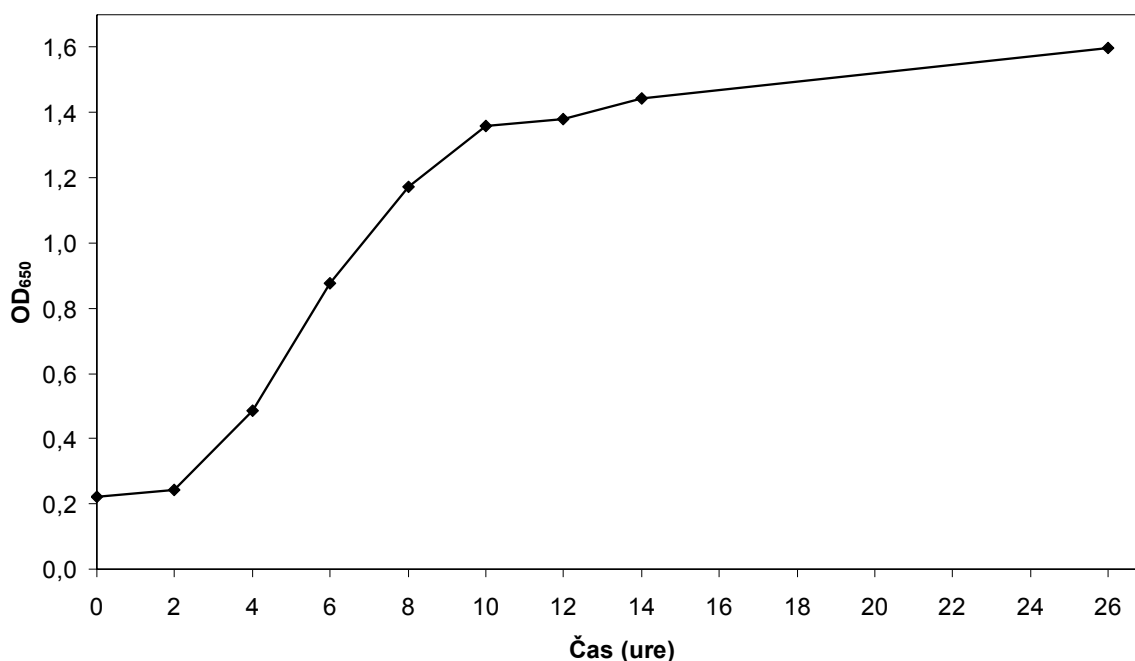
Med potekom alkoholne fermentacije smo po posameznem vzorčenju spremljali pH bioprocesne brozge, sproščanje CO₂ (posredno s tehtanjem fermentorjev), spreminjanje OD₆₅₀ (rast kvasovk) ter z analizami HPLC porabo sladkorjev (glukoza, fruktoza) in nastajanje ključnih metabolitov fermentacije (etanol, glicerol, očetna kislina). Ob koncu fermentacije smo preverili živost kvasne biomase z nacepljanjem posameznih razredčitev na YM plošče ter s pomočjo vitalnega barvanja z metilenskim modrilom in štetjem s hemocitometrom pod mikroskopom.

Preverili smo tudi aktivnost glikolitičnih encimov (heksokinaza, fosfofruktokinaza in piruvat kinaza). Zaradi "majhne" količine mokre biomase, smo aktivnost encimov ovrednotili le ob zaključku fermentacije.

V drugem delu poskusa smo se osredotočili na del fermentacije, ki poteka najbolj burno. To pomeni, da se takrat porabi največ sladkorjev oziroma se sprosti največ CO₂. Določili smo ga glede na rezultate celotne fermentacije v prvem delu poskusa. Tako smo vzorčili ob inokulaciji in po sedmih dneh poteka fermentacije. Določali smo aktivnosti glikolitičnih encimov, porabo sladkorjev ter sintezo etanola, glicerola in očetne kisline.

V tem poglavju so predstavljeni rezultati dela, ki je potekalo od 7.4.2005 do 17.8.2005.

4.1 KULTIVACIJA KVASOVKE IN NAMNOŽEVANJE VCEPKA

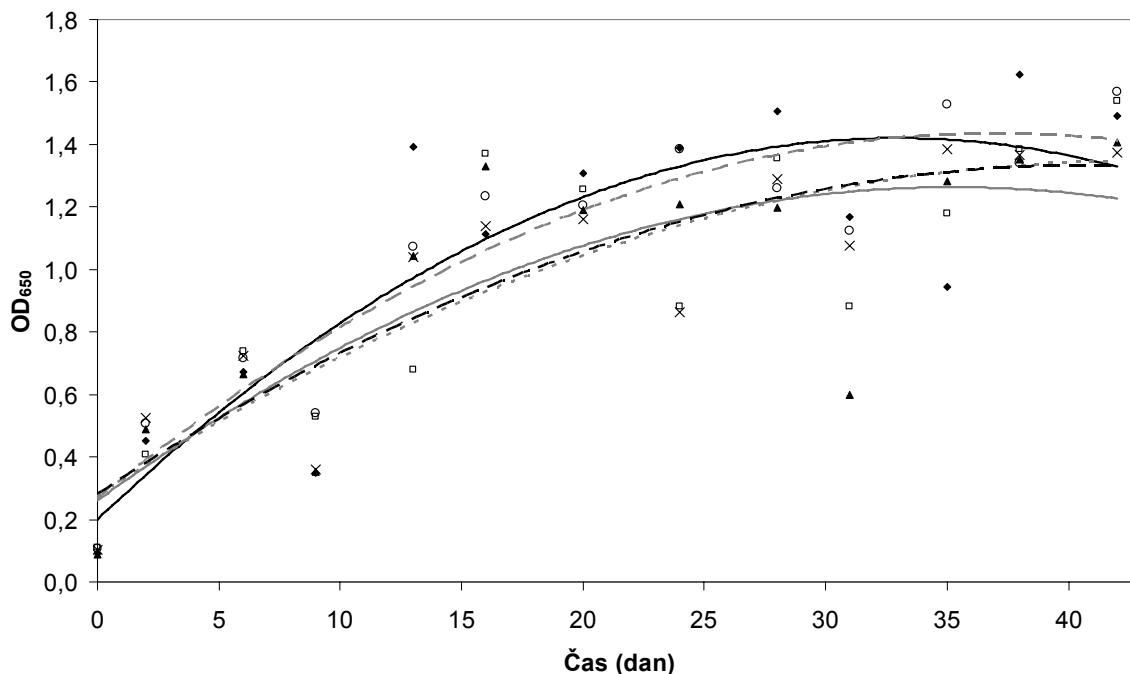


Slika 4: Rastna krivulja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 1927 pri 28 °C med 26 urnim aerobnim submerznim namnoževanjem na stresalniku (200 vrt./min).

Na sliki 4, ki ponazarja rastno krivuljo kvasovke *S. cerevisiae*, je razvidna tipična krivulja rasti mikroorganizmov. Iz slike je možno razbrati, da so kvasovke po začetni fazi prilagajanja, po treh urah kultivacije vstopile v eksponentno fazo rasti. Kvasni inokulum smo namnoževali 25 ur do optične gostote 1,6. S tem smo zagotovili zadostno koncentracijo celic za začetek poskusa. Namnožene kvasovke smo desetkrat razredčili s fiziološko raztopino in s pomočjo Bürker-Türkovega hemocitometra določili število kvasovk v mililitru gojišča. Potreben volumen gojišča za inokulacijo fermentorjev smo preračunali glede na zahtevo, da mora biti v moštu (1000ml) skupna začetna koncentracija kvasovk približno $1 \cdot 10^5$ CFU/ml (Povhe Jemec, 2003).

4.2 FERMENTACIJA KEMIJSKO DEFINIRANEGA MOŠTA (CDM) S ČISTO KULTURO KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1 Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo



Slika 5: Spreminjanje vrednosti OD_{650} med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (◆; —), 300 g/l glc in 100 g/l fru (□; ----), 200 g/l glc in 200 g/l fru (▲; —), 100 g/l glc in 300 g/l fru (○; ----), 400 g/l glc in 100 g/l fru (×; ----), 400 g/l fru (*; ----). Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Na sliki 5, ki ponazarja spreminjanje vrednosti OD_{650} zaradi rasti *S. cerevisiae* v posameznem CDM gojišču, je mogoče opaziti porast kvasovk v vseh gojiščih v prvih petih dneh alkoholne fermentacije. Trend naraščanja OD_{650} se nadaljuje še nekje do 20. dne fermentacije, a naklon krivulj je vidno manjši. V nadaljnjem poteku alkoholne fermentacije se OD_{650} postopoma ustali in nekje po 35. dneh upade. Vidimo, da so najvišje povprečne vrednosti OD_{650} dosegle kvasovke, ki so rastle v gojišču s 400 g/l glukoze, podobno dinamiko rasti so imele kvasovke med fermentacijo v gojišču z začetno vsebnostjo 100 g/l glukoze in 300 g/l fruktoze. V preostalih treh gojiščih z 200 g/l glc in 200 g/l fru; s 300 g/l glc in 100 g/l fru oziroma s 400 g/l fru opazimo skoraj identično "rastno krivuljo".

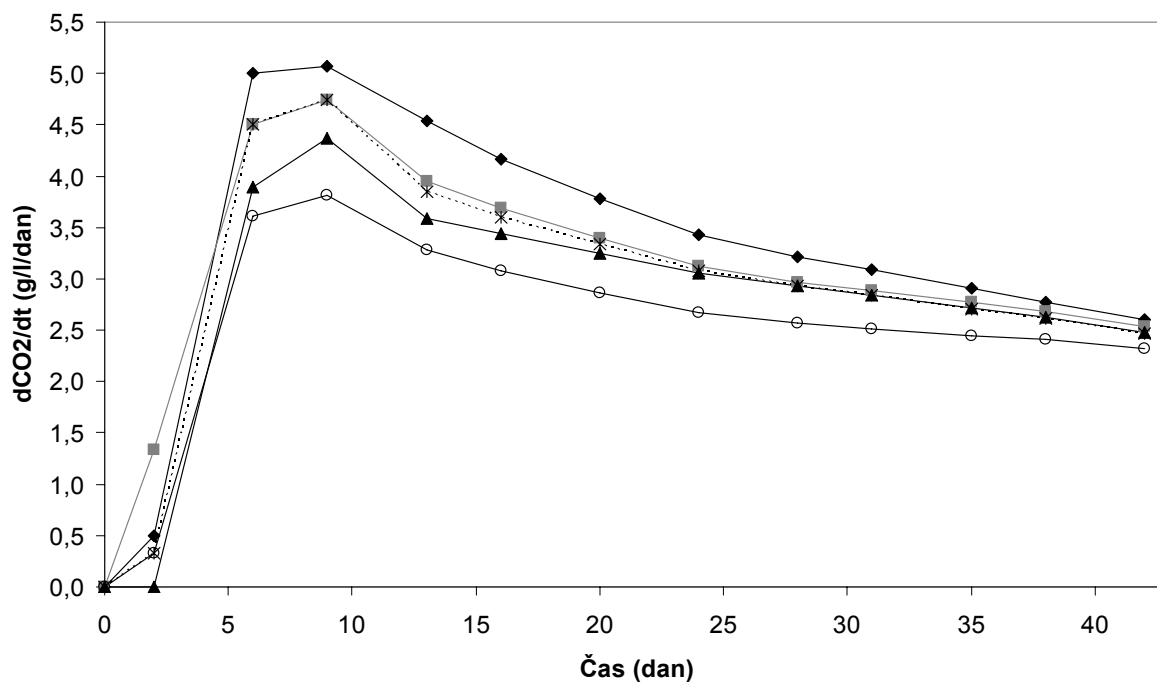
Glede na rezultate podane v preglednici 1 vidimo, da odstotek živih celic narašča glede na naraščajočo začetno vsebnost fruktoze v CDM gojišču. Po 42. dneh fermentacije je odstotek živih celic kvasovk v gojiščih s 400 g/l glc oziroma s 300 g/l glc in s 100 g/l fru najnižji in znaša 36 oziroma 38 %. Živost po fermentaciji v gojišču z 200 g/l glc in z 200 g/l fru oziroma s 100 g/l glc in s 300 g/l fru je višja glede na prej omenjeni gojišči kar za 6 – 9 %. Po fermentaciji v gojišču, ki je vsebovalo samo 400 g/l fruktoze pa je bila končna živost kvasovk 57 %, to je kar za 21 % višja kot po fermentaciji v gojišču, ki vsebuje čisto glukozo. V zadnjem stolpcu preglednice 1 so podani rezultati števila kolonijskih enot po

42. dneh alkoholne fermentacije. Število celic narašča z naraščanjem začetne koncentracije fruktoze v mediju. Tako je v mediju s samo fruktozo približno petkrat več CFU/ml v primerjavi s številom v gojišču z glukozo.

Preglednica 1: Ocena živosti kvasovk in število CFU/ml po končani 42 dnevni fermentaciji v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	Hemocitometer			YM plošče
	Vse kvas.*10 ⁶ /ml	Žive kvas.*10 ⁶ /ml	Živost (%)	CFU*10 ⁶ / ml
400/0	2,0	0,7	36	0,9
300/100	1,9	0,7	38	2,0
200/200	2,4	1,0	44	2,7
100/300	2,0	0,9	45	4,4
0/400	2,2	1,2	57	5,5

4.2.2 Sproščanje CO₂

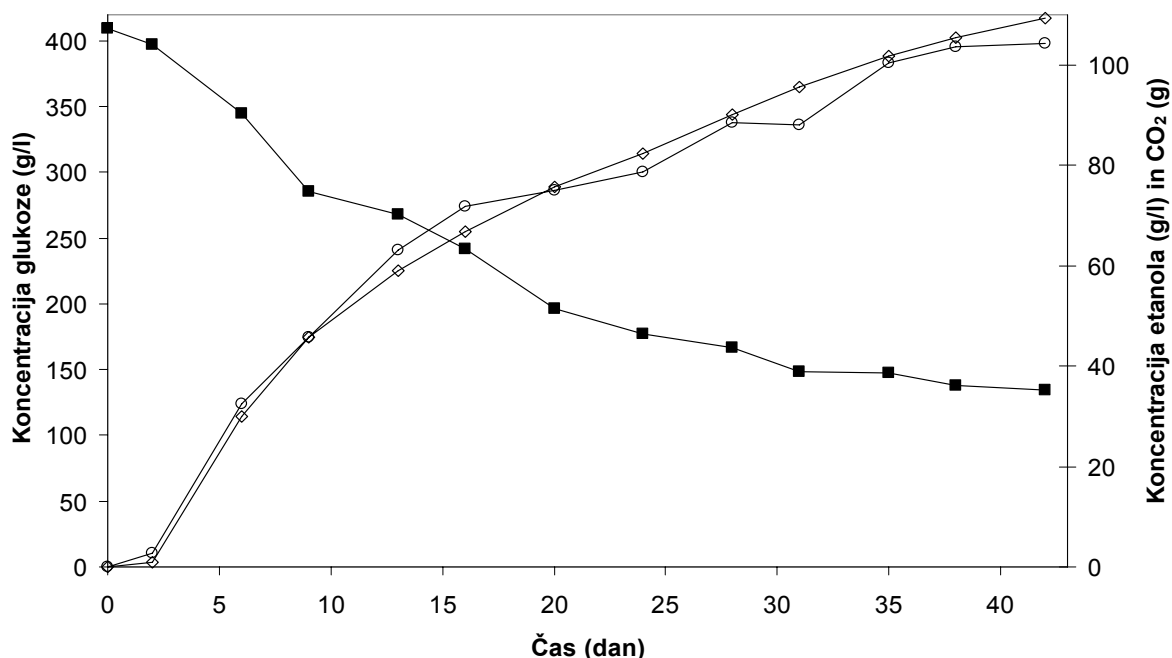


Slika 6: dCO₂/dt med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (◆), 300 g/l glc in 100 g/l fru (■), 200 g/l glc in 200 g/l fru (▲), 100 g/l glc in 300 g/l fru (⊙), 400 g/l fru (○). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

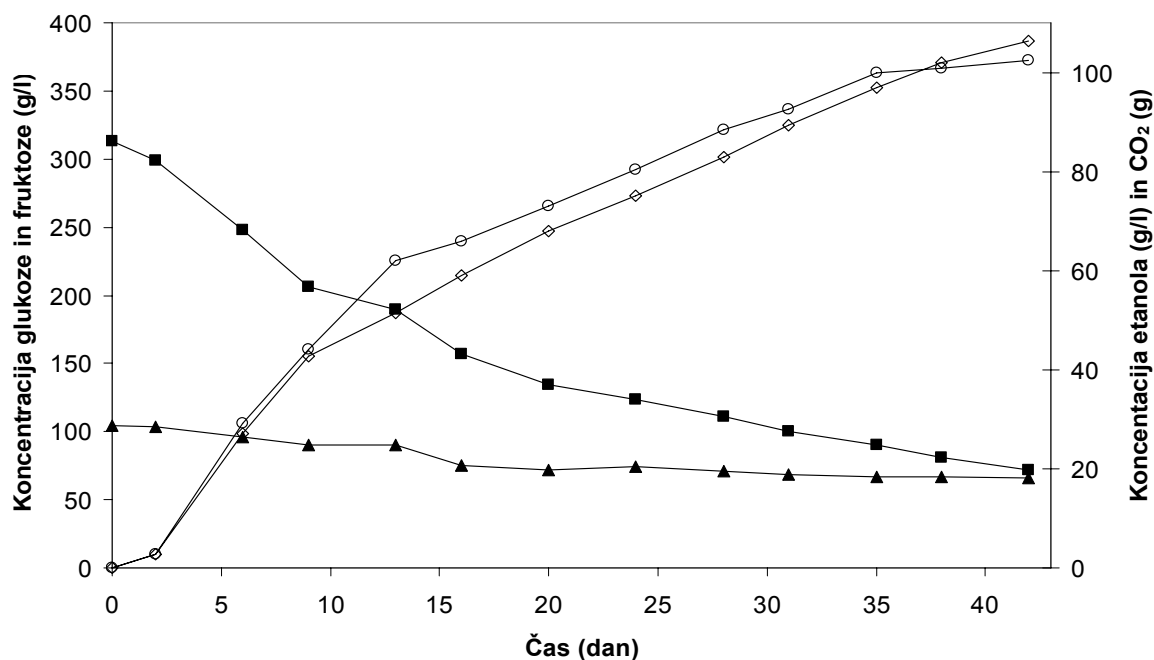
V vseh petih alkoholnih fermentacijah je tvorba CO₂ (g/l/dan) sledila enakemu vzorcu. Razlike so bile v količini sproščenega CO₂. V fazi prilagajanja celične rasti (prvih 2 do 3 dni rasti) je bila količina sproščenega CO₂ minimalna. Med šestim in nekje desetim dnevom fermentacije se je sprostil največ CO₂, med 4 – 5 g/l/dan. Sledilo je postopno upadanje tvorbe CO₂, ki se je proti koncu fermentacije približala vrednosti 3 g/l/dan. Med enološko fermentacijo se je največ CO₂ sprostil med fermentacijo kvasovk v gojišču z glukozo, najmanj pa med fermentacijo fruktoze (Priloga F8). Količina nastalega CO₂ med fermentacijo v preostalih treh gojiščih je bila nekje med količinama, ki sta nastali med rastjo na glukozni oziroma fruktozi. Upadanje tvorbe CO₂ sovpada z naraščanjem začetne koncentracije fruktoze v gojišču.

4.2.3 Fermentacijski profili

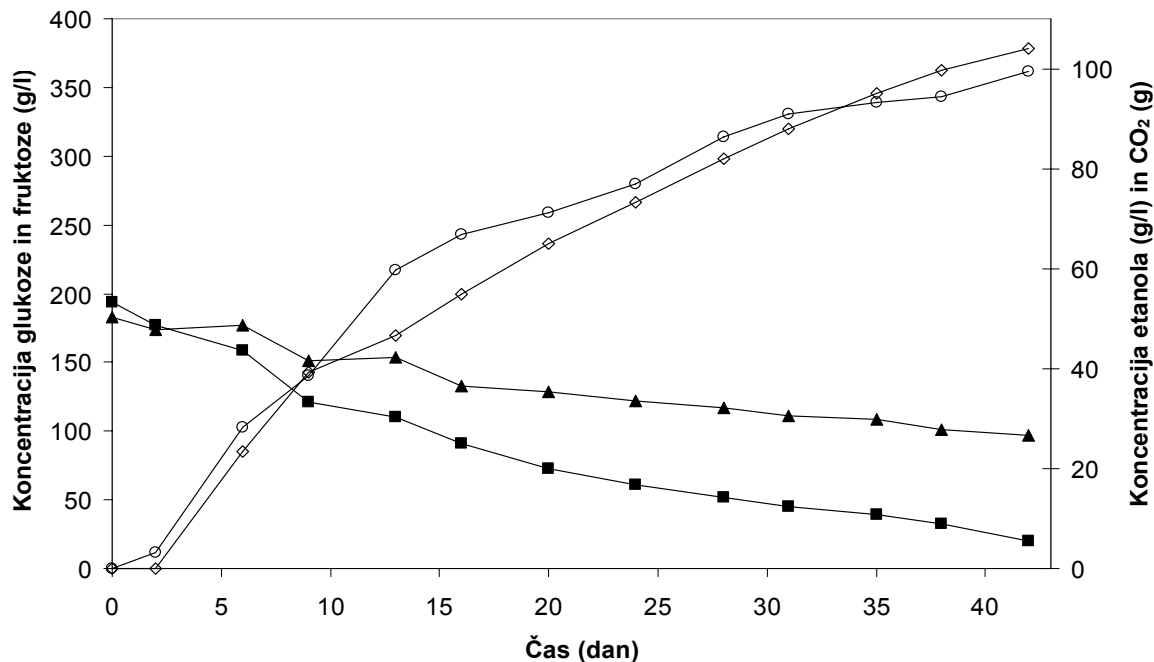
Slike 7 do 11 prikazujejo porabo sladkorjev glukoze in fruktoze ter tvorbo etanola in CO₂ tekom alkoholnih fermentacij v gojiščih CDM z različnim začetnim razmerjem glukoze in fruktoze s kvasovko *S. cerevisiae*. Iz naklonov krivulj, ki ponazarjajo porabo glukoze in fruktoze vidimo, da se glukoza hitreje porablja (Slike 8,9,10). Med fermentacijo v gojiščih, z višjo oziroma enako začetno vsebnostjo glukoze glede na vsebnost fruktoze (Slike 7,8,9), nastaja več etanola in CO₂ kot pa med fermentacijo v gojiščih z višjim deležem fruktoze (Sliki 10,11). Porabi sladkorjev je sorazmeren nastanek etanola in CO₂ kot končnih produktov metabolizma sladkorjev.



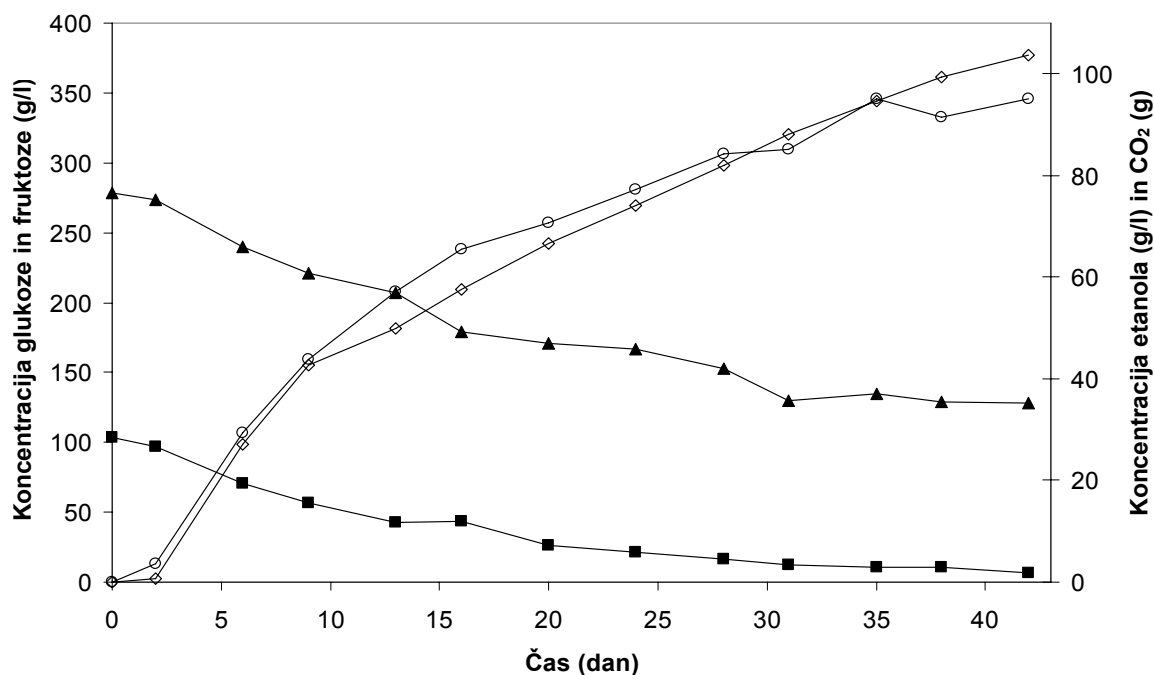
Slika 7: Fermentacijski profil za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojišču s 400 g/l glukoze. Prikazana je poraba glukoze (-■-) ter tvorba etanola (-○-) in CO₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.



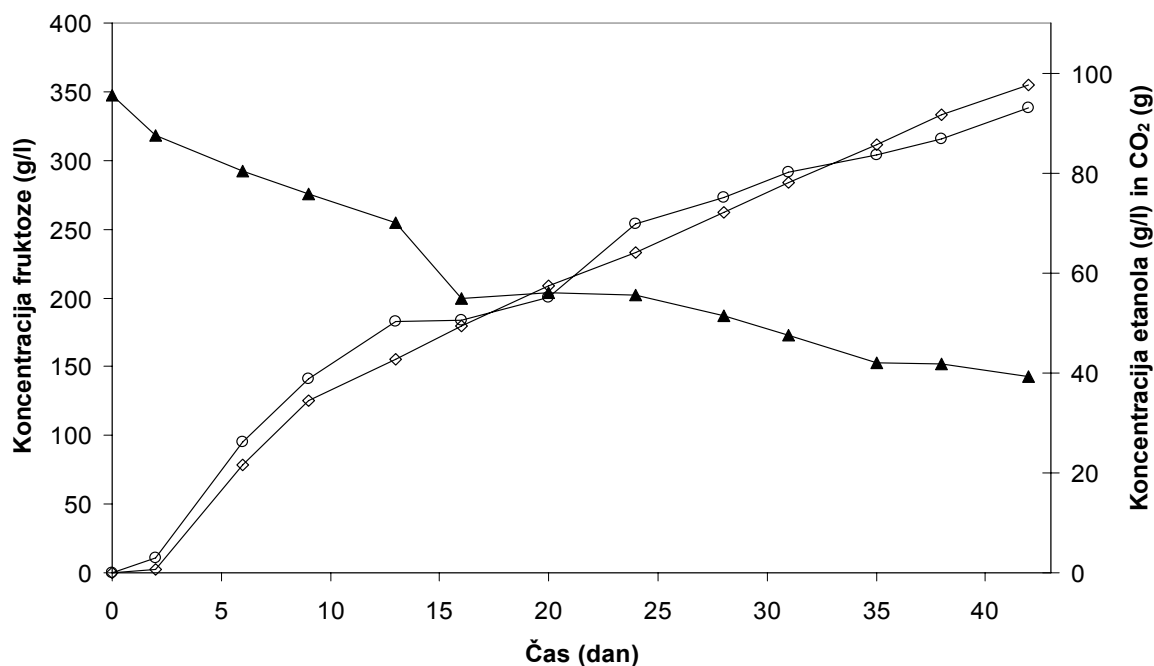
Slika 8: Fermentacijski profil za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojišču s 300 g/l glukoze in s 100 g/l fruktoze. Prikazana je poraba glukoze (-■-) in fruktoze (-▲-) ter tvorba etanola (-○-) in CO₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.



Slika 9: Fermentacijski profil za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojišču z 200 g/l glukoze in z 200 g/l fruktoze. Prikazana je poraba glukoze (-■-) in fruktoze (-▲-) ter tvorba etanola (-○-) in CO₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

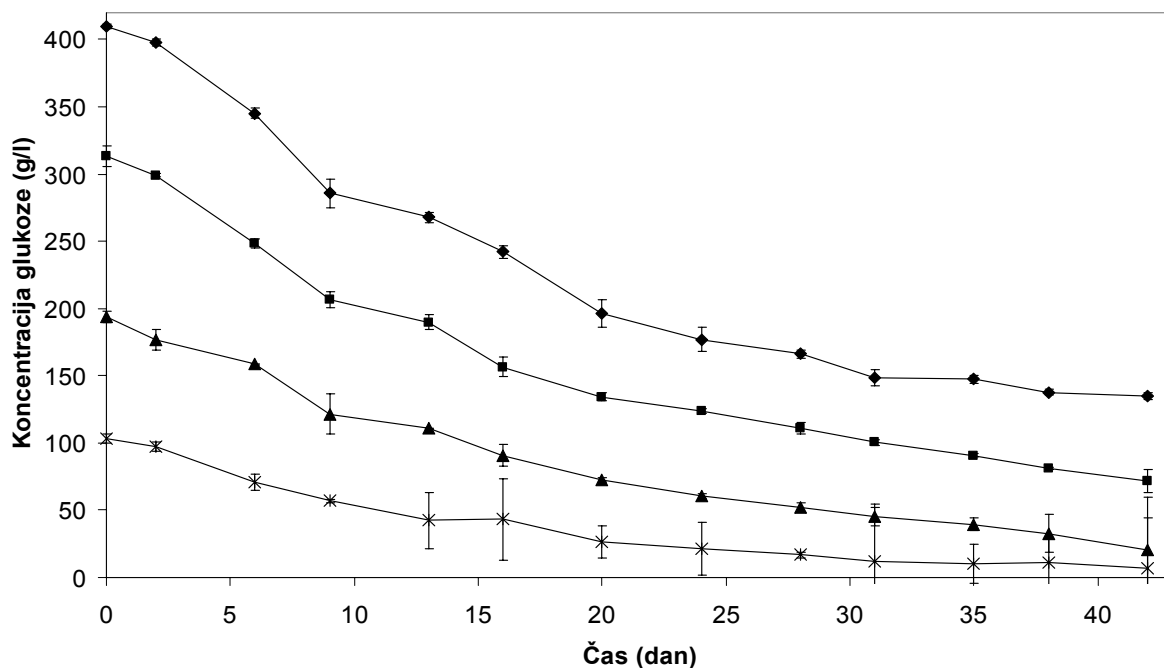


Slika 10: Fermentacijski profil za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojišču s 100 g/l glukoze in s 300 g/l fruktoze. Prikazana je poraba glukoze (-■-) in fruktoze (-▲-) ter tvorba etanola (-○-) in CO₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

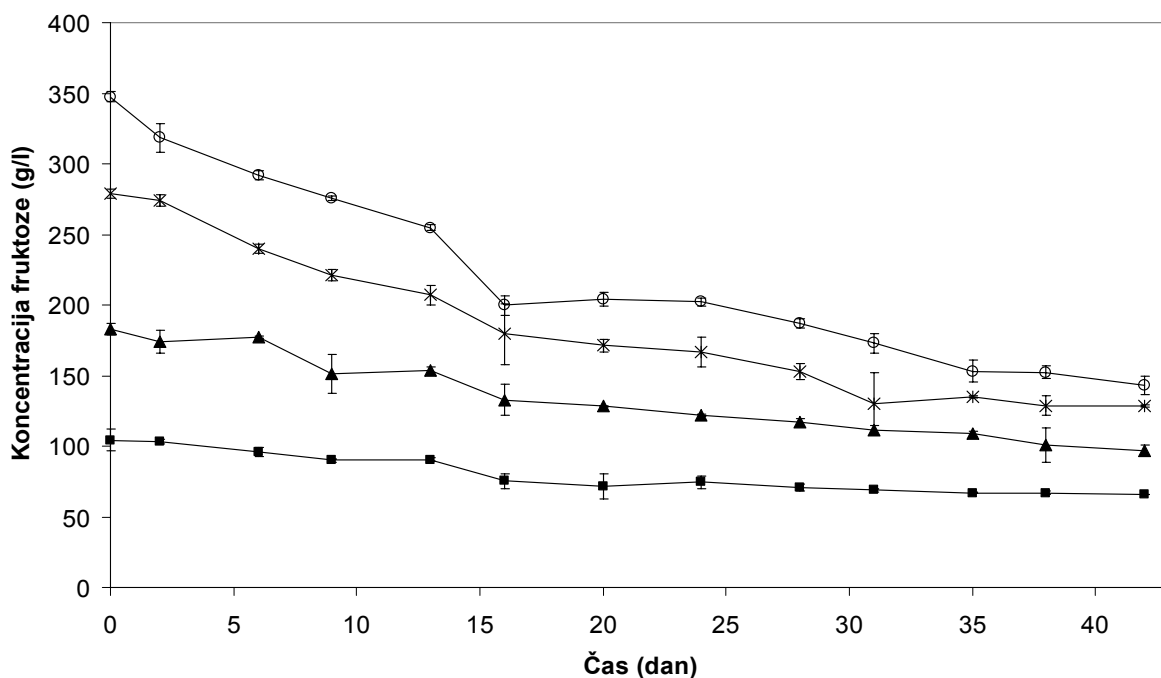


Slika 11: Fermentacijski profil za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojišču s 400 g/l fruktoze. Prikazana je poraba fruktoze (-▲-) ter tvorba etanola (-○-) in CO₂ (-◇-) v 42 dnevni fermentaciji. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

4.2.4 Dinamika porabe sladkorjev v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem sladkorjev



Slika 12: Poraba glukoze med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-*-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

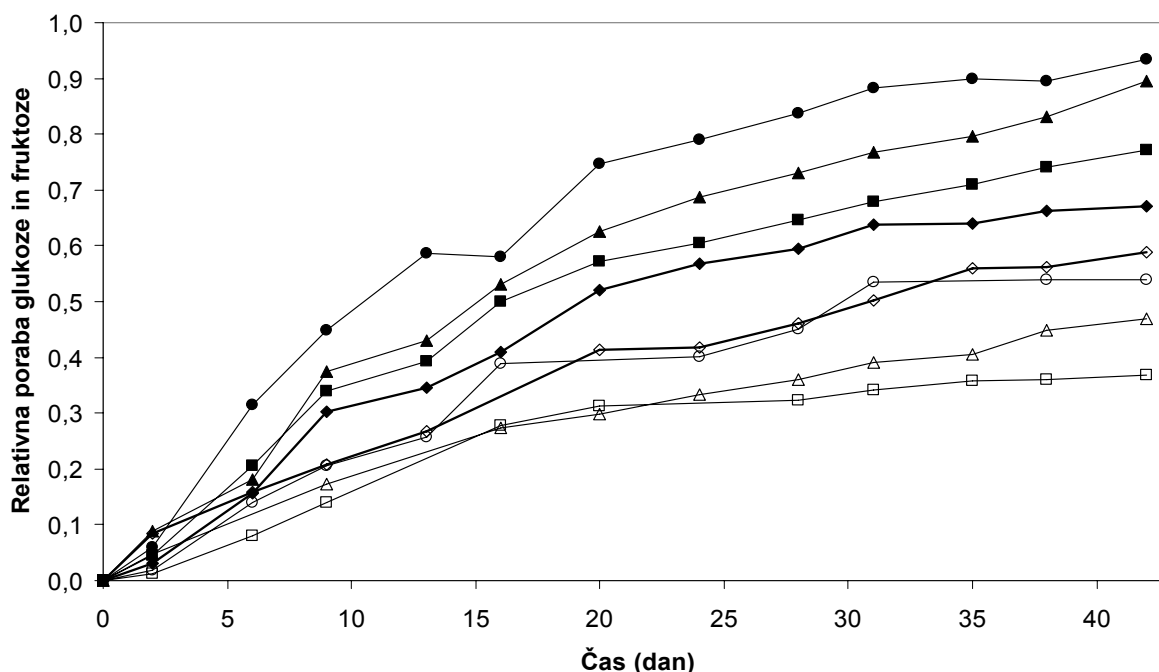


Slika 13: Poraba fruktoze med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-*-), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Preglednica 2: Poraba sladkorjev po 42 dnevni alkoholni fermentaciji. Rezultati so izračuni glede na začetne in končne koncentracije sladkorjev v gojiščih.

Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	Glukoza		Fruktoza		Glukoza in fruktoza	
	Poraba (g/l)	Poraba(%)	Poraba (g/l)	Poraba(%)	Poraba (g/l)	Poraba(%)
400/0	274,8	67,1	/	/	/	/
300/100	241,3	77,1	38,5	36,8	279,7	67,0
200/200	173,4	89,5	85,8	47,0	259,2	68,8
100/300	96,3	93,4	150,6	54,0	246,9	64,6
0/400	/	/	204,6	58,9	/	/

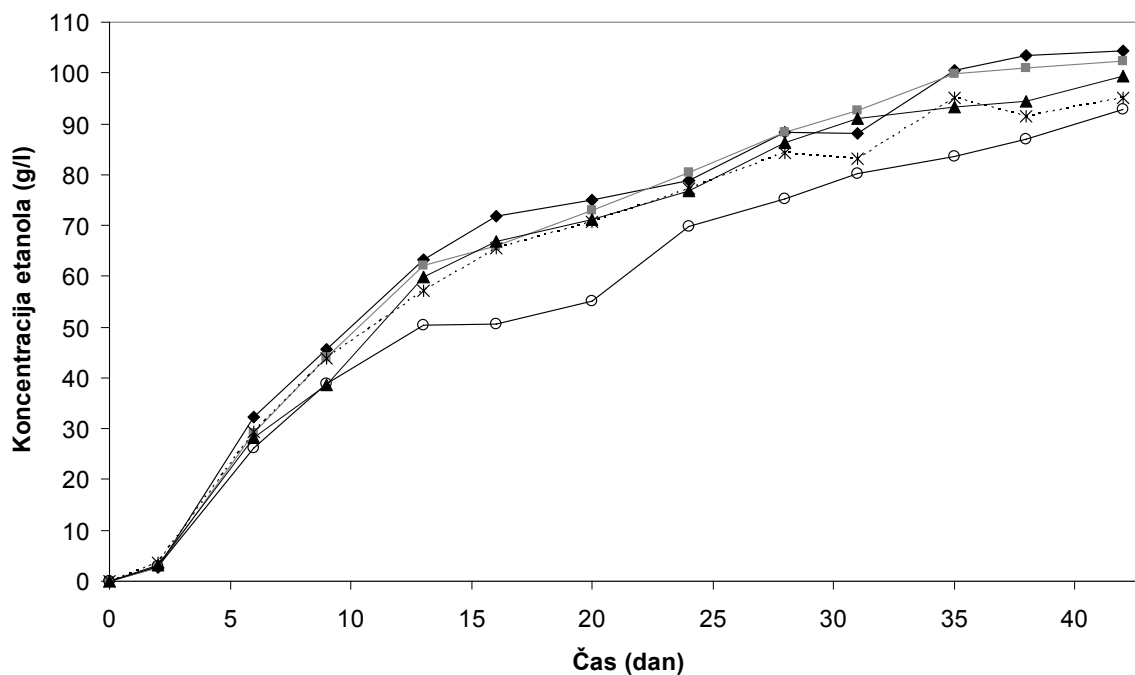
Sliki 12 ter 13 in preglednica 2 podajajo porabo sladkorjev tekom fermentacije. Največji delež porabljenih sladkorjev je bil v gojišču z 200 g/l glukoze in z 200 g/l fruktoze. Podoben odstotek sladkorjev je bil porabljen tudi v gojišču s samo glukozo oziroma v gojišču s tremi četrtinami glukoze. Med fermentacijo fruktoze so kvasovke v 42. dneh porabile približno 59 % tega sladkorja, to je 8 % manj kot med fermentacijo glukoze. Če primerjamo sliki 12 in 13 vidimo, da imajo krivulje, ki ponazarjajo porabo glukoze, večji naklon. To pomeni, da se je glukoza iz gojišču tekom enološke fermentacije hitreje porabljala. V gojišču s 300 g/l glukoze in s 100 g/l fruktoze ostane po 42. dneh fermentacije več kot 60 % fruktoze, porabi pa se 77 % glukoze. Z naraščanjem fruktoze v gojišču se te porabi več, a hkrati se porabi tudi velika večina glukoze (približno 90 %).



Slika 14: Relativna poraba glukoze in fruktoze v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-♦-); 400 g/l fru (-◇-); 300 g/l glc (-■-) in 100 g/l fru (-□-); 200 g/l glc (-▲-) in 200 g/l fru (-△-); 100 g/l glc (-●-) in 300 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Relativna poraba sladkorjev med alkoholno fermentacijo se je spreminjala kot podaja slika 14. Opazimo, da se je najhitreje porabljala glukoza v gojišču s 100 g/l glc in s 300 g/l fru. Sledila je poraba glukoze v gojišču z 200 g/l tega sladkorja, nato poraba glukoze v gojišču s 300 g/l glukoze, še nižja pa je bila relativna poraba glukoze v gojišču, ki je vsebovalo samo glukozo. Relativna poraba fruktoze v vseh gojiščih je zaostajala za porabo glukoze. Vidimo, da se je v gojiščih s 400 g/l fru oziroma s 300 g/l fru porabil podoben delež teh sladkorjev. Isto velja za gojišči z 200 g/l fru in s 100 g/l fru, čeprav je bila v slednjih poraba nižja glede na prej omenjeni gojišči. Na silki 12 je dobro vidna razlika v preostali količini sladkorjev glukoze in fruktoze po zaustavitvi fermentacije. Vedno je večji delež preostalega sladkorja predstavljala fruktoza.

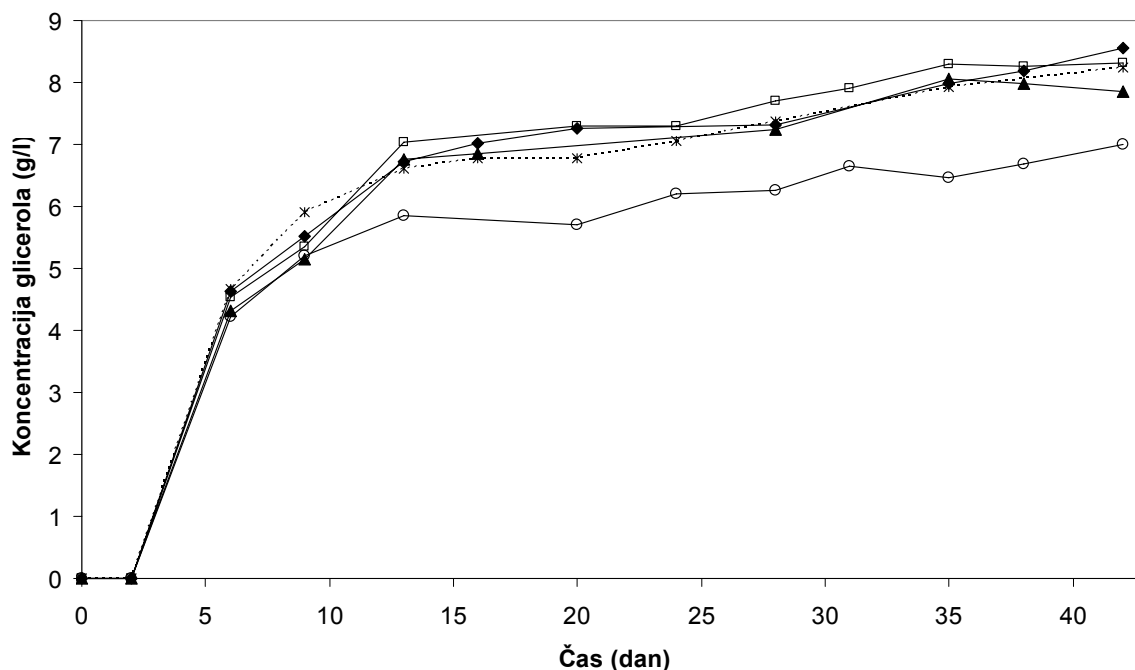
4.2.5 Dinamika tvorbe metabolnih produktov v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem sladkorjev



Slika 15: Tvorba etanola med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza : 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-*·*), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Iz slike 15 je razvidno, da povečana koncentracija fruktoze v gojišču zmanjša tvorbo etanola tekom enološke fermentacije. Nekje do 10. dneva fermentacije so koncentracije nastalega etanola v posameznem gojišču med sabo primerljive, kasneje pa pride do odstopanj. Največje razlike v tvorbi etanola so vidne med fermentacijo fruktoze. Nastane kar za 12 % manj etanola v primerjavi s tvorbo med fermentacijo glukoze oziroma med fermentacijo v gojiščih z glukozo in fruktozo. Krivulja tvorbe etanola med fermentacijo

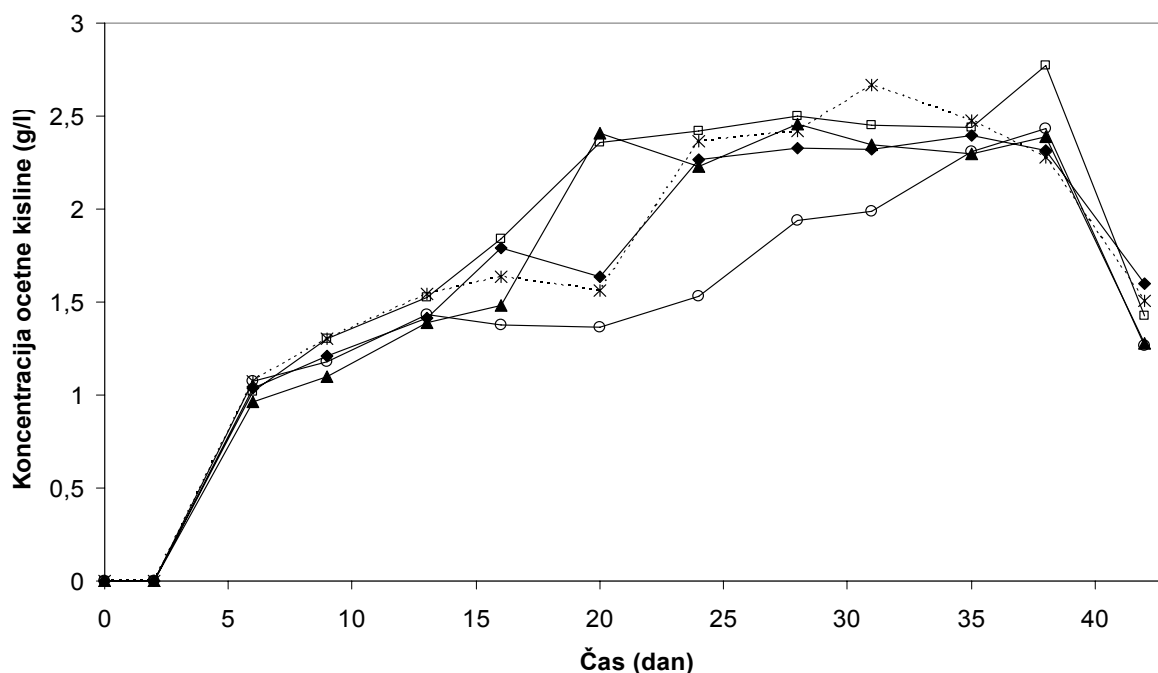
fruktoze počasneje narašča med 10. in 25. dnevom fermentacije, kasneje pa opazimo podobno hitrost tvorbe etanola kot v ostalih gojiščih.



Slika 16: Tvorba glicerola med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-□-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-·*·), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

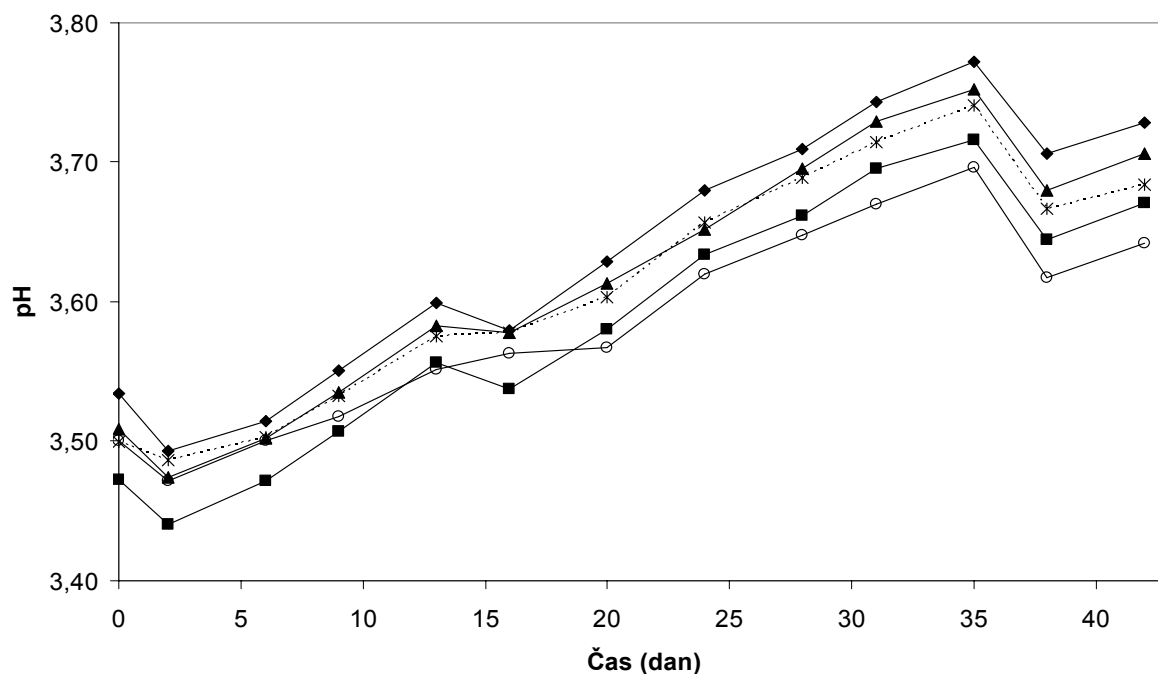
V vzorcih odvzetih iz vseh fermentorjev smo zaznali naraščanje tvorbe glicerola tekom fermentacije (Slika 16). Prvih 6 dni fermentacije so kvasovke v vseh gojiščih proizvedle podobno količino glicerola, to je od 4,2 – 4,7 g/l, kasneje pa se je količina nastalega glicerola v posameznem gojišču razlikovala. Najmanj glicerola so tvorile kvasovke med fermentacijo fruktoze. Dosegle so končno koncentracijo 7,0 g/l. V preostalih gojiščih je končna koncentracija glicerola znašala 7,8 – 8,6 g/l. Med samo fermentacijo v slednjih medijih je koncentracija glicerola nihala, višja je bila v gojiščih s 300 g/l glukoze in s 100 g/l fruktoze.

Tako kot tvorba glicerola je bila tudi tvorba očetne kisline v prvih šestih dneh enološke fermentacije v vseh gojiščih podobna (Slika 17). Prvih 6 dni fermentacije so kvasovke tako proizvedle približno 1 g/l očetne kisline, kasneje pa se je količina kisline v posameznem gojišču razlikovala. Najmanj očetne kisline je nastalo med fermentacijo fruktoze. V preostalih gojiščih je količina očetne kisline tekom enološke fermentacije močno nihala. Na sliki 17 opazimo upad koncentracije očetne kisline med 38. in 42. dnevom alkoholne fermentacije v vseh petih gojiščih.



Slika 17: Tvorba ocetne kisline med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-□-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-*·-), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

4.2.6 Sprememba vrednosti pH med alkoholno fermentacijo



Slika 18: Spreminjanje vrednosti pH med alkoholno fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* v gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza: 400 g/l glc (-◆-), 300 g/l glc in 100 g/l fru (-■-), 200 g/l glc in 200 g/l fru (-▲-), 100 g/l glc in 300 g/l fru (-*·-), 400 g/l fru (-○-). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Slika 18 prikazuje spreminjanje vrednosti pH tekom enološke fermentacije v petih gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Začetni pH neinokuliranih gojišč je zasedal vrednosti med 3,47 in 3,53. Vidimo, da je v prvih 2. dneh fermentacije v vseh gojiščih upadel, nato pa je začel naraščati. Po 35. dneh fermentacije je v vseh gojiščih narastel za približno 0,2. Potem je upadel in se po 42. dneh spet malo povišal. Če primerjamo spreminjanje pH v posameznih gojiščih, vidimo, da so krivulje med sabo skoraj vzporedne, vrednost pH se v vseh gojiščih tekom enološke fermentacije spreminja podobno.

4.3 OVREDNOTENJE NAJBOLJ "BURNE" FAZE ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili med 42 dnevno enološko fermentacijo, smo omejili poskus na najbolj buren del fermentacije. Osredotočili smo se na del kjer pride do najbolj intenzivne porabe sladkorjev. Glede na metabolno aktivnost kvasovk, ki jo lahko ocenimo preko tvorbe CO₂ (Slika 6) med fermentativno porabo sladkorjev, smo določili, da je najbolj buren del procesa potekel nekje med 5. in 10. dnem alkoholne fermentacije s kvasovko *S. cerevisiae*. Vzorčili smo po 7. dneh fermentacije. Naredili smo tri neodvisne gojitve kvasovke v gojiščih s samo glukozo oziroma fruktozo in v gojišču z 200 g/l glukoze in z 200 g/l fruktoze.

4.3.1 Poraba sladkorjev

V preglednici 3 so podane začetne in končne koncentracije sladkorjev v gojiščih ter odstotek porabljenega sladkorja po sedmih dneh fermentacije. Največ sladkorja se je porabilo med rastjo kvasovke v gojišču s 400 g/l glukoze (prbl. 36 %). Najmanj pa med rastjo na fruktozi (20 %). Med rastjo v gojišču z začetno vsebnostjo sladkorjev 200 g/l glukoze in 200 g/l glukoze se je porabilo malo več glukoze kot fruktoze. Celokupna poraba sladkorjev v slednjem gojišču je bila za približno 10 % nižja od porabe glukoze za 6 % višja od porabe fruktoze, ki sta bili edina vira ogljika za kvasovke v prvem oziroma tretjem gojišču.

Preglednica 3: Poraba glukoze in fruktoze (g/l) po 7. dneh alkoholne fermentacije s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojišču z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Konc. glc/fru v gojišču(g/l)	Glukoza (g/l)				Fruktoza (g/l)			
	to	t ₇	Poraba	Poraba (%)	to	t ₇	Poraba	Poraba (%)
400/0	391,17	250,90	140,27	35,9	/	/	/	/
200/200	188,98	136,36	52,62	27,8	201,11	152,24	48,86	24,3
0/400	/	/	/	/	347,55	277,42	70,13	20,2

4.3.2 Tvorba metabolnih produktov in spremljanje porasta biomase

Preglednica 4: Tvorba etanola, glicerola in očetne kisline (g/l) po 7. dneh alkoholne fermentacije s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojišču z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV (%), ki so rezultat treh neodvisnih gojitev.

t ₇ Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	Etanol (g/l)			Glicerol (g/l)			Očetna kislina (g/l)		
	Povpr.	SD	KV(%)	Povpr.	SD	KV(%)	Povpr.	SD	KV(%)
400/0	53,68	3,87	7,21	5,40	0,47	8,75	1,53	0,11	7,35
200/200	51,21	4,22	8,23	6,17	0,17	2,75	1,81	0,11	5,88
0/400	50,79	3,77	7,41	5,66	0,08	1,41	1,77	0,05	2,72

V preglednici 4 so podane koncentracije metabolnih produktov etanola, glicerola in očetne kisline, ki so nastali po 7. dneh enološke fermentacije s kvasovko *S. cerevisiae*. Tvorba etanola se v gojiščih z različno vsebnostjo sladkorjev fruktoze in glukoze ni močno razlikovala. Rahlo povišana je bila v gojišču z začetno vsebnostjo 400 g/l glukoze. Največ glicerola je nastalo med fermentacijo v gojišču z 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze. V gojiščih s čisto fruktozo oziroma glukozo pa je prišlo do tvorbe podobne koncentracije glicerola. Tvorba očetne kisline je sledila vzorcu tvorbe glicerola v posameznem gojišču.

Preglednica 5: Sprememba vednosti pH, OD₆₅₀, tvorba CO₂, količina suhe biomase (g/l) in število CFU/ml po 7. dneh alkoholne fermentacije. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	pH			OD ₆₅₀		CO ₂	gSB/l		CFU*10 ⁶ /ml
	t ₀	t ₇	ΔpH	t ₀	t ₇	t ₇	t ₀	t ₇	t ₇
400/0	3,506	3,530	0,024	0,091	1,422	50,7±3,2	0,09±0,04	1,31±0,18	6,0
200/200	3,486	3,506	0,020	0,081	1,279	47,0±7,5	0,07±0,01	1,03±0,17	7,5
0/400	3,510	3,524	0,014	0,080	1,355	45,0±2,6	0,05±0,03	1,06±0,13	5,5

V preglednici 5 so razvidne ostale spremembe v sestavi gojišča in celične biomase po 7. dneh fermentacije. Vrednost pH rastnih medijev se je povišala. Do največjega povišanja je prišlo med fermentacijo kvasovk v gojišču z glukozo. V slednjem gojišču je tudi OD₆₅₀ po sedmih dneh fermentacije najvišja in sovпада z najvišjo količino določene suhe biomase in sproščenega CO₂. Količine sproščenega CO₂ se v vseh treh gojiščih med sabo ne razlikujejo veliko, opazimo pa rahlo upadanje sproščenega CO₂ glede na porast koncentracije fruktoze v mediju. Tudi število CFU/ml so med sabo primerljive, najnižje je v gojišču s 400 g/l fruktoze.

4.3.3 Hitrosti porabe sladkorjev in izkoristki po 7. dneh alkoholne fermentacije

Preglednica 6: Maksimalna specifična hitrost rasti, specifične hitrosti (q) porabe sladkorjev in tvorbe etanola, glicerola in CO₂ po 7. dneh fermentacije. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev, podan je standardni odklon (SD).

Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	$\mu_{\max} \pm SD$ (h ⁻¹)	$q_s \pm SD$ (g sladk./gSB/h)	$q_{EtOH} \pm SD$ (g EtOH/gSB/h)	$q_{glic} \pm SD$ (g glic/gSB/h)	$q_{CO_2} \pm SD$ (g CO ₂ /gSB/h)
400/0	0,018 ± 0,004	0,70 ± 0,23	-0,26 ± 0,04	-0,026 ± 0,003	-0,25 ± 0,03
200/200	0,016 ± 0,001	0,64 ± 0,14	-0,32 ± 0,04	-0,039 ± 0,006	-0,29 ± 0,03
0/400	0,020 ± 0,006	0,42 ± 0,05	-0,30 ± 0,03	-0,034 ± 0,005	-0,27 ± 0,03

Preglednica 7: Izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase (Y_{X/S}) in tvorbo etanola (Y_{E/S}) po 7. dneh fermentacije. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev, podan je standardni odklon (SD).

Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	Y _{X/S} ± SD (gSB/g sladk.)	Y _{E/S} ± SD (g EtOH/g sladk.)
400/0	0,009 ± 0,003	0,39 ± 0,08
200/200	0,010 ± 0,002	0,51 ± 0,07
0/400	0,014 ± 0,002	0,72 ± 0,04

Iz preglednic 6 in 7 je razvidno, da povišana koncentracija fruktoze v gojišču zmanjša specifično hitrost porabe sladkorjev (q_s). To pomeni, da je bila v gojišču s 400 g/l glukoze, kot edinim fermentabilnim sladkorjem, hitrost porabe sladkorjev najvišja. Izkoristek sladkorjev za tvorbo biomase (Y_{X/S}) pa se z naraščanjem koncentracije fruktoze povečuje. Prav tako pride do povišanja izkoristka sladkorjev za tvorbo etanola (q_E), ko je v gojišču prisotna fruktoza. Najvišje specifične hitrosti tvorbe glicerola, etanola in CO₂ so bile v mediju z začetno koncentracijo sladkorjev 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze, najnižje pa v mediju z začetno koncentracijo 400 g/l glukoze. Med enološko fermentacijo so najvišjo maksimalno specifično hitrost rasti (μ_{max}) dosegle kvasovke, ki so porabljale čisto fruktozo, bila je za 20 % višja kot maksimalna specifična hitrost rasti med fermentacijo v gojišču z 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze in za 10 % višja kot med fermentacijo čiste glukoze.

4.4 SPECIFIČNA AKTIVNOST GLIKOLITIČNIH ENCIMOV

4.4.1 Po 7. dneh fermentacije

Preglednica 8: Specifična aktivnost glikolitičnih encimov (U/mg) po 7. dneh alkoholne fermentacije v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	HXK(U/mg)			PFK (U/mg)			PYK (U/mg)		
	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)
400/0	0,79	0,16	20,17	0,12	0,03	21,94	0,35	0,06	17,75
200/200	0,59*	0,11	18,80	0,12	0,03	26,32	0,36	0,07	20,13
0/400	0,34*	0,05	13,66	0,14	0,02	14,29	0,38	0,07	19,94

*statistično značilna razlika: $p < 0,05$ ($n \geq 5$)

4.4.2 Po 42. dneh fermentacije

Preglednica 9: Specifične aktivnosti glikolitičnih encimov (U/mg) po 42. dneh alkoholne fermentacije v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	HXK(U/mg)			PFK(U/mg)			PYK(U/mg)		
	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)	Povpr.	SD	KV (%)
400/0	1,02	0,07	6,98	0,08	0,01	6,93	1,54	0,07	4,33
300/100	0,92	0,12	12,60	0,13	0,03	20,35	1,53	0,11	7,21
200/200	0,75*	0,11	15,31	0,08	0,01	15,06	1,75	0,15	8,28
100/300	0,56*	0,06	10,31	0,13*	0,02	11,46	1,96*	0,12	6,22
0/400	0,54*	0,12	21,50	0,26*	0,03	13,32	2,08*	0,16	7,81

*statistično značilna razlika: $p < 0,05$ ($n \geq 3$)

V preglednicah 8 in 9 so podane specifične aktivnosti glikolitičnih encimov kvasovke *S. cerevisiae* v 7. in 42. dnevu enološke fermentacije. Aktivnosti heksokinaze (HXK) in piruvat kinaze (PYK) so v 7. dnevu fermentacije nižje kot v 42. dnevu. Specifična aktivnost HXK je v 42. dnevu fermentacije za 1,3 do 1,6-krat višja v primerjavi z aktivnostjo ob 7. dnevu fermentacije. Povišane koncentracije fruktoze v gojišču vplivajo na aktivnost glikolitičnih encimov. Aktivnost HXK se v 7. in 42. dnevu zmanjšuje s povečano začetno vsebnostjo fruktoze v gojišču. Specifična aktivnost PYK narašča s povečano vsebnostjo fruktoze v ravnem mediju. Specifična aktivnost PYK po 42. dneh je tako 4,4 do 5,5-krat višja, kot je bila v najbolj burnem delu procesa, in v obeh točkah procesa narašča z naraščajočo koncentracijo fruktoze v mediju. Do statistično značilne spremembe specifične

aktivnosti HXK, PFK in PYK v 42. dnevnu fermentacije, glede na specifično aktivnost encimov v mediju s 400 g/l glukoze, pride med fermentacijo v mediju s 100 g/l glukoze in 300 g/l fruktoze ter s 400 g/l fruktoze. Meritve specifične aktivnosti fosfofruktokinaze (PFK) niso pokazale specifičnega vzorca, ki ga opazimo pri encimih HXK in PYK. Statistično značilno povečanje aktivnosti encima PFK se pokaže v 42. dnevnu fermentacije v mediju z začetno koncentracijo fruktoze 400 g/l. Vidimo, da je bila specifična aktivnost PFK najvišja med rastjo kvasovk v gojišču s čisto fruktozo v 42. dnevnu fermentacije. Bila je približno 2-krat višja od aktivnosti istega encima v istem gojišču v 7. dnevnu fermentacije.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V zadnjem času pri vinskih fermentacijah prihaja do problemov zaradi prehitre zaustavitve fermentacije (Gafner in sod., 1996; Blateyron in sod., 2001). Posledično dobimo vino z manjšo vsebnostjo etanola in večjim deležem preostalega sladkorja. Analiza je zato nujno potrebna, da ugotovimo možne vzroke zaustavitve fermentacije in jo tako lahko preprečimo s predhodno analizo mošta. Eden izmed možnih vzrokov prehitre zaustavitve fermentacije je fruktoza, ki lahko preko različnih mehanizmov povzroči zaustavitev.

Z delom smo hoteli pokazati vpliv razmerja glukoza/fruktoza na potek alkoholne fermentacije s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Med fermentacijo v medijih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza nas je zanimala poraba obeh sladkorjev, tvorba nekaterih kvasnih metabolitov ter specifična aktivnost treh ključnih glikolitičnih encimov.

5.1 KULTIVACIJA KVASOVK IN NAMNOŽEVANJE VCEPKA

Čisto kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (ZIM 1927) smo po trikratnem precepljanju na trdnem YM gojišču prenesli v erlenmajerice s stransko kiveto, ki so vsebovale kemijsko definiran mošt (CDM) s skupno vsebnostjo glukoze in fruktoze 10 g/l (glej točko material in metode 3.3.1.1). Za namnoževanje biomase smo uporabili CDM gojišče z manjšo koncentracijo sladkorjev, ker bi visoke koncentracije, ki smo jih imeli med fermentacijo v posameznih CDM gojiščih, negativno vplivale na metabolizem kvasovk in samo razmnoževanje (Carrasco in sod., 2003). Kvasovke so se iz začetne vrednosti optične gostote OD_{650} 0,2 namnožile v desetih urah kultivacije in ob vstopu v stacionarno fazo rasti dosegle povprečno optično gostoto 1,4 (Slika 4). Kvasni inokulum smo namnoževali 25 ur do optične gostote 1,6. S tem smo zagotovili zadostno koncentracijo celic za začetek poskusa. Število kvasovk smo določili s pomočjo Bürker-Türk-ovega hemocitometra. Potreben volumen gojišča za inokulacijo fermentorjev smo preračunali glede na zahtevo, da mora biti v moštu (1000 ml) skupna začetna koncentracija kvasovk približno $1 \cdot 10^5$ CFU/ml (Povhe Jemec, 2003).

5.2 FERMENTACIJA KEMIJSKO DEFINIRANEGA MOŠTA (CDM) S ČISTO KULTURO KVASOVKE *Saccharomyces cerevisiae*

Fermentacija je potekala pri temperaturi 16 – 20 °C. Vse poskuse smo izvedli v treh ponovitvah. Kot gojišče smo uporabili kemijsko definiran mošt (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992), ki simulira pogoje naravnega mošta. Pri fermentaciji smo uporabili 5 različnih CDM gojišč. V vseh gojiščih je bila začetna koncentracija sladkorjev približno 400 g/l. Razlikovala so se v deležu posameznega sladkorja – glukoze in fruktoze (Priloga B). Vzorčili smo vsake 3 – 4 dni, ob vzorčenju smo s tehtanjem določili tvorbo CO_2 , vzorcem smo izmerili vrednosti pH in OD_{650} ter nato izvedli HPLC analize.

5.2.1 Spremljanje rasti kvasovk med fermentacijo in sproščanje CO₂

Krivulje, ki ponazarjajo spremembo OD₆₅₀ v času fermentacije, so rezultat "polinomnega glajenja" (funkcija v programu Excel) posameznih točk izmerjene OD₆₅₀ ob vzorčenju, ker je ta preveč nihala, da bi lahko dobili krivuljo kar na podlagi posameznih točk (Slika 5). Seveda smo se pri tem zavedali, da te meritve povedo malo o dejanskem številu kvasovk v bioprocesni brozgi, saj je povišanje OD₆₅₀ tudi posledica prisotnih celičnih delcev odmrlih celic v brozgi in ne samo viabilnih celic. Vseeno pa lahko iz krivulj spreminjanje OD₆₅₀ v času zaradi rasti *S. cerevisiae* v posameznem CDM gojišču, sklepamo, da je fazi prilagajanja sledila eksponentna faza rasti v prvih petih dneh alkoholne fermentacije. Trend naraščanja OD₆₅₀ se je nadaljeval nekje do 20. dne fermentacije, a naklon krivulj je vidno manjši. Glede na tvorbo CO₂ (Slika 6) lahko zaključimo, da so bile kvasovke že v stacionarni fazi rasti, a so bile še metabolno aktivne, saj je CO₂ še nastajal. Proti koncu fermentacije je nastalo manj CO₂, kar je bilo posledica manjše metabolne aktivnosti kvasovk. Med fermentacijo viabilna populacija kvasovk v moštu naraste od začetnih vrednosti 10⁴–10⁶ CFU/ml na 10⁸–10⁹ CFU/ml. Gre za tipično rast mikroorganizmov v zaprtem sistemu (Fleet in Heard, 1992). Pri našem poskusu pa so se kvasovke namnožile le do 10⁷ CFU/ml (Preglednica 1). Najvišje povprečne vrednosti OD₆₅₀ so dosegle kvasovke v gojišču s 400 g/l glukoze, najnižje pa v gojišču s čisto fruktozo. Tudi produkcija CO₂ je sledila podobni kinetiki. Sklepamo, da so kvasovke med fermentacijo glukoze dosegle najvišje celično število. V gojiščih s 300 g/l glc in s 100 g/l fru; z 200 g/l glc in z 200 g/l fru oziroma s 400 g/l fruktoze opazimo skoraj identično "rastno krivuljo", tvorba CO₂ pa se je med fermentacijo v slednjih treh gojiščih razlikovala. Tako lahko zaključimo, da je med fermentacijo povišanih koncentracij fruktoze prišlo do namnožitve kvasovk do podobnega števila, a so bile kasneje tekom fermentacije metabolno manj aktivne zaradi vpliva višjih koncentracij fruktoze v gojišču.

Ob zaključku alkoholne fermentacije smo ocenili živost kvasne populacije v posameznih CDM gojiščih (Preglednica 1). Količino celic, prisotnih v vzorcu smo določili z dvema neposrednima metodama (Kirsop in Painting, 1989; McMekeen in sod., 1993), ki omogočata določiti skupno število celic (žive in mrtve) in količino celic, ki so sposobne vegetativnega razmnoževanja. Z metodo štetja celic s hemocitometrom in barvanjem celične suspenzije smo določili skupno število kvasovk/ml in delež živih celic. S tehniko štetja kolonijskih enot pa vse kvasovke, ki so bile sposobne iz ene celice tvoriti kolonijo (CFU).

Odstotek živih celic po 42. dneh enološke fermentacije narašča glede na naraščajoče razmerje fruktoze v posameznem CDM gojišču. To potrjujejo tudi vrednosti za CFU/ml v posameznem gojišču. Povečana živost celic med fermentacijo v gojiščih z višjim deležem fruktoze je verjetno posledica nižjega osmotskega pritiska fruktoze v vodni raztopini v primerjavi z glukozo (Ozbas in Yalcin, 2004). Razliko v številu aktivnih celic določenih z metodo vitalnega barvanja in štetja s hemocitometrom ter metodo štetja kolonijskih enot, lahko pripišemo slabšemu pomešanju fermentorjev pred vzorčenjem ali napaki med razredčevanjem vzorcev po Kochu.

5.2.2 Dinamika porabe sladkorjev in tvorbe metabolnih produktov v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem sladkorjev

V vzorcih, ki smo jih jemali tekom fermentacije, smo porabo sladkorjev in tvorbo glavnih metabolnih produktov določali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Luparia in sod., 2004). Alkoholna fermentacija je potekala v petih gojiščih, ki so se razlikovala v začetnem razmerju sladkorjev glukoze in fruktoze. Glede na literaturne vire (Varela in sod., 2004) je pri normalnih fermentacijah po dokončanju le-teh količina preostalih sladkorjev manjša od 4 g/l. V našem poskusu je znašala od 117 do 143 g/l preostalega sladkorja. To je posledica višjih začetnih koncentracij sladkorjev v kemijsko definiranem gojišču (400 g/l) v primerjavi z dejansko koncentracijo sladkorjev v grozdnem soku (140-260 g/l) (Bisson, 1992).

Glukozo so kvasovke porabljale hitreje kot fruktozo, kar je razvidno iz naklona krivulj porabe sladkorjev v odvisnosti od časa fermentacije (Slike 7 – 13). To je najverjetneje posledica različnih afinitet prenašalcev do obeh sladkorjev (Reifenberger in sod., 1997). Kvasovke so po začetni fazi eksponentne rasti, ki je trajala približno pet dni, vstopile v fazo stacionarne rasti (Slika 5). Metabolno aktivnost kvasovk tekom fermentacije smo posredno spremljali z določanjem tvorbe CO₂, etanola in porabe sladkorjev. Prenehanje celične rasti ne pomeni, da so celice prenehale biti metabolno aktivne. Celice, ki so dosegle stacionarno fazo rasti in se ne delijo, so do neke mere še vedno metabolno aktivne. Dokaz je poraba fermentabilnih sladkorjev iz medija in produkcija CO₂ in etanola (Boulton in sod., 1996).

Če primerjamo relativno porabo glukoze in fruktoze v medijih, ki so vsebovali oba sladkorja, vidimo da so kvasovke preferenčno porabljale glukozo (Slika 14). Najhitreje se je porabljala glukoza v gojišču s 100 g/l glc in s 300 g/l fru. Sledila je poraba glukoze v gojišču z 200 g/l tega sladkorja, nato poraba glukoze v gojišču s 300 g/l glukoze. Relativna poraba fruktoze v vseh gojiščih je zaostajala za porabo glukoze. Po zaustavitvi fermentacije je večji delež preostalega sladkorja vedno predstavljala fruktoza (Slika 14, Preglednica 2). Med fermentacijo čiste fruktoze so kvasovke v 42. dneh porabile približno 59 % tega sladkorja, to je 8 % manj kot pa med fermentacijo čiste glukoze. Če primerjamo sliki 12 in 13 vidimo, da imajo krivulje, ki ponazarjajo porabo glukoze večji naklon. To pomeni, da se glukoza iz gojišča tekom enološke fermentacije hitreje porablja. V gojišču s 300 g/l glukoze in s 100 g/l fruktoze ostane po 42. dneh fermentacije več kot 60 % fruktoze, porabi pa se 77 % glukoze. Z naraščanjem fruktoze v gojišču se te porabi več, a hkrati se porabi tudi velika večina glukoze (približno 90 %).

V literaturnih virih so se s problemom upočasnjene porabe fruktoze med enološko fermentacijo ukvarjali Berthels in sod. (2004). Dokazali so, da na začetku fermentacije, ko je hitrost porabe sladkorjev maksimalna, ni velike razlike v porabi glukoze in fruktoze. To pomeni, da razlika v razmerju glukoza/fruktoza (GF) v mediju ostane relativno majhna. Ko pa se totalna poraba sladkorjev upočasni, se poraba fruktoze bolj upočasni kot poraba glukoze, zato se GF razmerje močno zniža. Pomembno je poudariti, da gre pri nihanju GF razmerja tekom fermentacije za tipičen vzorec, ki je odvisen od časa in seva.

Možna vzroka za preferenčno porabo glukoze med enološko fermentacijo sta višja afiniteta prenašalcev za glukozo (Bisson in Fraenkel, 1983; D'Amore in sod., 1989) ter višja afiniteta encimov, ki fosforilirajo sladkorja po vstopu v kvasno celico za glukozo (Flores in sod., 2000). Fruktozo sta zmožni fosforilirati le dve kinazi (HXK1 in HXK 2), medtem ko glukozo lahko fosforilirajo tri (HXK1, HXK2 in GLK1). So pa še drugi možni vzroki. Kvasovke imajo sladkorne senzorje, vsaj eden od njih ima drugačno afiniteto za glukozo kot za fruktozo (Rolland in sod., 2002). Domnevajo tudi, da katabolno represijo med rastjo na fruktozi lahko sproži drugačen mehanizem v primerjavi z represijo z glukozo (de Winde in sod., 1996). Za učinkovitost fermentacije je potreben dovolj velik vir asimilirajočega dušika. Ob hitri porabi dušika med enološko fermentacijo pride posledično do inaktivacije transporta sladkorjev in zato do redukcije stopnje fermentacije proti koncu alkoholne fermentacije (Salmon, 1989). Berthels in sod. (2004) so z dodajanjem vira dušika v drugem delu fermentacijskega procesa dokazali, da pride po dodatku do znatno povečane porabe fruktoze glede na porabo glukoze. Ta naj bi bila posledica preprečitve razgradnje heksoznih prenašalcev z višjo afiniteto za fruktozo. Tudi razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih obeh sladkorjev lahko razložijo nižjo afiniteto transportnega sistema in heksokinaz za fruktozo (Flood in sod., 1996). Poleg zgoraj naštetih možnih vzrokov za razliko v porabi glukoze in fruktoze med enološko fermentacijo je eden od možnih dejavnikov tudi vpliv povišanih koncentracij etanola, ki se akumulira med fermentacijo (Bai in sod., 2003).

Porabi sladkorjev je sorazmeren nastanek etanola in glicerola, ki sta dva izmed mnogih končnih produktov metabolizma sladkorjev z vinsko kvasovko *S. cerevisiae*. Med alkoholno fermentacijo se je postopoma povečevala koncentracija etanola. Večina sintetiziranega etanola je nastala med stacionarno fazo rasti (Slika 15). Končna koncentracija je segala od 104,29 g/l do 92,92 g/l (Priloga F4) in je bila odvisna od začetne koncentracije posameznega sladkorja v gojišču. Z naraščanjem začetne koncentracije fruktoze v mediju je koncentracija nastalega etanola upadala. Poleg hiperosmotskega stresa, ki je posledica povišanih koncentracij sladkorjev v ravnem mediju, lahko na kvasovke negativno deluje tudi etanolni stres, ki se povečuje z naraščanjem koncentracije etanola v mediju. Etanol, ki nastane med fermentacijo s *S. cerevisiae*, je lahko vzrok za upočasnjeno oziroma zaustavljeno enološko fermentacijo (Bai in sod., 2003; Berthels in sod., 2004).

Poleg etanola kvasovke med enološko fermentacijo proizvajajo še številne druge metabolite. Končna koncentracija glicerola, ki je kvantitativno drugi najpomembnejši produkt vinske fermentacije, je znašala od 7,01 do 8,56 g/l glede na posamezen rastni medij (Priloga F5). Večina ga je nastala v prvih šestih dneh poteka fermentacije, kot odziv na neravnovesje redukcijskih ekvivalentov v kvasnih celicah (Ozbas in Yalcin, 2004) in kot odziv na povišan osmotski stres (Nevoigt in Stahl, 1997). Najmanj glicerola so tvorile kvasovke med fermentacijo fruktoze (Slika 16). V vinih je najmanjša zahtevana koncentracija glicerola od 4 do 6 g/l (Pravilnik o spremembah..., 2004). Najbrž je tvorba višjih koncentracij glicerola med poskusom posledica višjih začetnih koncentracij sladkorjev v ravnem mediju v primerjavi z dejansko koncentracijo glukoze in fruktoze v grozdnem soku.

Med drugimi pomembnimi komponentami kvasovke proizvajajo tudi očetno kislino. V prvih šestih dneh poteka alkoholne fermentacije je bila koncentracija očetne kisline v vseh medijih približno enaka (Slika 17), kasneje pa je prišlo do večjih razlik v koncentraciji. Najmanj očetne kisline je nastalo med fermentacijo fruktoze. V preostalih gojiščih je količina očetne kisline tekom enološke fermentacije močno nihala. Končne koncentracije so znašale od 1,27 do 1,60 g/l (Priloga F6). Najmanjše zakonsko zahtevane koncentracije očetne kisline v vinih so 1,0 g/l za bela in rose vina, 1,8 g/l za vrhunska ledena vina in jagodni izbor ter 2,1 g/l za suhi jagodni izbor (Pravilnik o spremembah..., 2004). Tako glede na naše rezultate vidimo, da je koncentracija očetne kisline ustrezala koncentraciji, ki jo lahko vsebuje vino.

Spreminjanje vrednosti pH medija med fermentacijo je posledica metabolne aktivnosti kvasovk. Krivulje, ki podajajo spreminjanje vrednosti pH v gojiščih z različnim razmerjem sladkorjev so med sabo skoraj vzporedne (Slika 18), vrednosti pH se v vseh gojiščih tekom enološke fermentacije spreminjajo podobno. Med enološko fermentacijo pride do značilnega porasta vrednosti pH mošta med 0,1 in 0,2 enote (Rotter, 2005). To smo opazili tudi med našim poskusom.

5.3 OVREDNOTENJE NAJBOLJ "BURNE" FAZE ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Najbolj buren del fermentacije smo določili glede na rezultate celotne fermentacije v prvem delu poskusa. Gre za del enološke fermentacije med katerim se porabi največ sladkorjev oziroma se tvori največja količina etanola in CO₂. Glede na naše rezultate naj bi bil nekje med 6. in 10. dnevom poteka fermentacije. Za vzorčenje smo izbrali 7. dan fermentacije. V vzocih smo določali vrednosti pH, OD₆₅₀, specifične aktivnosti glikolitičnih encimov ter porabo sladkorjev in sintezo etanola, glicerola in očetne kisline. Fermentacija je potekala pri temperaturi 20 – 22 °C. Vse poskuse smo izvedli v treh ponovitvah. Kot gojišče smo uporabili kemijsko definiran mošt, ki je vseboval 400 g/l glukoze; 200 g/l glukoze in 200 g/l fruktoze oziroma 400 g/l fruktoze. V vzorcih odvzetih ob inokulaciji in po 7. dnevih fermentacije smo določili tudi količino suhe biomase.

5.3.1 Poraba sladkorjev, tvorba metabolnih produktov in spremljanje porasta biomase

Po 7. dnevih enološke fermentacije s kvasovko *S. cerevisiae*, v zgoraj omenjenih gojiščih, se največji delež sladkorjev porabi, ko kvasovke fermentirajo glukozo, najmanj pa, ko je edini sladkor v gojišču fruktoza (Preglednica 3). Vrednost pH rastnih medijev se je povišala. Do največjega povišanja je prišlo med fermentacijo kvasovk v gojišču z glukozo. V slednjem gojišču je tudi vrednost OD₆₅₀ po 7. dnevih fermentacije najvišja in sovпада z najvišjo količino določene suhe biomase in sproščenega CO₂. Količine sproščenega CO₂ se v vseh treh gojiščih med sabo ne razlikujejo veliko, opazimo pa upadanje sproščenega CO₂ glede na porast koncentracije fruktoze v mediju. Tudi vrednosti CFU/ml so med sabo primerljive, najnižja pa je v gojišču s 400 g/l fruktoze (Preglednica 5).

Če primerjamo porabo sladkorjev, ki smo jo določili v prvem delu poskusa in po 7. dneh fermentacije v drugem delu poskusa, vidimo, da vrednosti v drugem delu poskusa sovpadajo s porabo sladkorjev, ki ustreza nekje 9. do 13. dnevno enološke fermentacije v prvem delu poskusa (Preglednica 3, Priloga F1). Povišana poraba sladkorjev je verjetno posledica višje temperature ob izvajanju drugega dela poskusa in posledično hitrejšega metabolizma kvasovk. Hitrost kvasnega metabolizma se povečuje s poviševanjem temperature do optimalne temperature, ki za *S. cerevisiae* znaša 35 °C (Torija in sod., 2003). Skladno s povišano porabo sladkorjev pride tudi do povišane tvorbe CO₂, etanola, glicerola in očetne kisline (Preglednici 4 in 5). Tvorba etanola, glicerola in očetne kisline je primerljiva s tvorbo slednjih metabolitov med 10. in 13. dnem enološke fermentacije v prvem delu poskusa.

5.3.2 Hitrosti porabe sladkorjev in izkoristki

Iz preglednic 6 in 7 je razvidno, da povišana koncentracija fruktoze v gojišču zmanjša specifično hitrost porabe sladkorjev. To pomeni, da je bila v gojišču s 400 g/l glukoze hitrost porabe sladkorjev najvišja. Nasprotno pa se izkoristek sladkorjev za tvorbo biomase z naraščanjem koncentracije fruktoze povečuje. Prav tako pride do povišanja izkoristka sladkorjev za tvorbo etanola, ko je v gojišču prisotna fruktoza. Specifične hitrosti tvorbe glicerola, etanola in CO₂ sledijo isti dinamiki. Med enološko fermentacijo se maksimalne specifične hitrosti rasti niso močno razlikovale glede na razmerje glukoze in fruktoze v rastnem mediju. Najvišjo specifično hitrost rasti so kvasovke dosegle med fermentacijo čiste fruktoze.

5.4 SPECIFIČNA AKTIVNOST GLIKOLITIČNIH ENCIMOV

Pri *S. cerevisiae* je aktivnost glikolitičnih encimov uravnavana na nivoju transkripcije in translacije genov, ki nosijo zapis za glikolitične encime. Glavni nivo regulacije encimske aktivnosti pa je preko alosterične kontrole (Flores in sod., 2000). Eden izmed alosteričnih regulatorjev, ki vplivajo na encimsko aktivnost je ATP. Glavni tarči inhibicije z ATP sta fosfofruktokinaza (PFK) in piruvat kinaza (PYK), čeprav delovanje PFK inhibirajo nižje celične koncentracije ATP kot delovanje PYK (Larsson in sod., 2000). ATP najbrž inhibira tudi delovanje encima heksokinaza (HXK). Splošno velja, da višje koncentracije ATP v celici znižajo tok skozi glikolizo, saj je celična potreba po ATP takrat nizka.

Povišane koncentracije fruktoze v gojišču vplivajo na aktivnost glikolitičnih encimov heksokinaze in piruvat kinaze (Preglednici 8 in 9). S poviševanjem začetne koncentracije fruktoze v gojišču pride do znižane aktivnosti heksokinaze in povišane aktivnosti piruvat kinaze. Specifična aktivnost encima fosfofruktokinaze je med fermentacijo fruktoze višja glede na aktivnost slednjega encima v medijih z obema sladkorjema ali le z glukozo.

Če primerjamo specifične aktivnosti encimov v 7. in 42. dnevno fermentacije, vidimo da so v 7. dnevno fermentacije te nižje. Nižja aktivnost glikolitičnih encimov je mogoče posledica visokih koncentracij celičnega ATP, ki inhibira delovanje encimov PFK in PYK (Larsson

in sod., 2000). V 42. dnevu fermentacije pa je aktivnost glikolitičnih encimov glede na 7. dan fermentacije povišana. Specifična aktivnost PYK je tako 4,4 do 5,5–krat višja, kot je bila v najbolj burnem delu procesa, in v obeh točkah procesa narašča z naraščajočim razmerjem fruktoze v mediju. Opazimo, da z naraščanjem koncentracije fruktoze v mediju specifična aktivnost HXK upada. Aktivnost HXK je povezana s porabo sladkorjev iz medija. S poviševanjem koncentracije fruktoze v mediju pride do manjše porabe sladkorjev in zato tudi do nižje specifične aktivnosti encima. Limitni korak porabe sladkorjev naj bi bil transport s strani heksoznih transporterjev, ki naj bi kazali preferenco do vnosa glukoze (Bisson in Fraenkel, 1983; D'Amore in sod., 1989). To lahko potrdimo, saj vemo, da transportu takoj sledi fosforilacija sladkorja z encimom HXK. Aktivnost slednjega encima nam zato lahko služi za oceno hitrosti vnosa sladkorjev v kvasno celico.

Poleg pomanjkanja znotrajceličnega ATP bi povišano delovanje glikolitičnih encimov po 42. dneh fermentacije v primerjavi s 7. dnem (10. – 13. dan, če upoštevamo temperaturne spremembe) lahko razložili s povišano potrebo celic po prekursorskih molekulah za tvorbo glicerola kot kompatibilnega topljenca pri odzivu na etanolni stres v mediju. Ta razlaga je najbrž manj verjetna, saj so v tej točki celice že dobro prilagojene na stresne pogoje. Poleg tega pa je specifična aktivnost encima PYK tudi visoka. Izgleda, da so kvasovke tudi po 42 dnevni fermentaciji v gojiščih s povišano vsebnostjo sladkorjev, še zmožne biti metabolno aktivne. To potrjuje tudi količina sproščenega CO₂ (Priloga F8). Možno pa je, da so kvasovke v 7. dnevu fermentacije pri 22 °C dosegle točko v kateri so postale občutljive na povišane koncentracije etanola v gojišču. Koncentracija etanola je znašala približno 50 g/l. Etanolni stres je lahko vzrok za preusmeritev toka intermediatov glikolitične poti v tvorbo glicerola. To pojasnjuje tudi nižjo aktivnost encima PYK.

Obstaja več možnih vzrokov, ki imajo za posledico upočasnjeno fermentacijo v medijih, ki vsebujejo večji delež fruktoze. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave, da bi na molekularnem nivoju okarakterizirali kinetiko in mehanizem porabe fruktoze med enološko fermentacijo.

5.5 SKLEPI

- ✓ Nižje razmerje glukoza/fruktoza v mediju povzroči upočasnitev enološke fermentacije.
- ✓ Z nižanjem razmerja glukoza/fruktoza pride do tvorbe manjših količin etanola, CO₂ in drugih kvasnih metabolitov.
- ✓ Povišane koncentracije fruktoze v mediju vplivajo na specifično aktivnost glikolitičnih encimov.
- ✓ Z nižanjem razmerja glukoza/fruktoza v mediju se specifična aktivnost heksokinaze zmanjšuje, aktivnost piruvat kinaze pa povečuje.
- ✓ Aktivnost encima fosfofruktokinaza je najvišja med fermentacijo fruktoze kot edinega sladkorja v gojišču.

6 POVZETEK

Saccharomyces cerevisiae, zaradi njene dobre prilagojenosti za rast v grozdnem soku med pogoji enološke fermentacije, pravimo kar vinska kvasovka. Med enološko fermentacijo vina poraba fruktoze iz medija vedno zaostaja za porabo glukoze. Možni vzroki za preferenčno porabo glukoze in ne fruktoze z glukofilno vinsko kvasovko *S. cerevisiae* so transport sladkorjev, fosforilacija sladkorjev, razlike v fizikalno–kemijskih lastnostih obeh sladkorjev, zaznavanje količine sladkorjev s senzorji, katabolna represija, omejitve s hranili, inhibitorno delovanje etanola in osmotski stres zaradi povišanih koncentracij sladkorjev v mediju.

Namen dela je bil ugotoviti vpliv razmerja glukoza/fruktoza v moštu na potek enološke fermentacije s kvasovko *S. cerevisiae*. Zato smo kot gojišče uporabili kemijsko definiran mošt, ki je vseboval različno začetno razmerje glukoze in fruktoze. Tekom enološke fermentacije smo spremljali porabo glukoze in fruktoze ter tvorbo etanola, glicerola in očetne kisline. Metabolno aktivnost kvasovk smo ocenili tudi preko tvorbe CO₂. Zanimalo nas je, kako povišane začetne koncentracije fruktoze v mediju vplivajo na porabo sladkorjev in na spekter metabolitov, ki se tvorijo tekom fermentacije. Vzorčili smo vsak 3. do 4. dan. Vzorcem smo določili tudi vrednost OD₆₅₀ in vrednost pH. Po 42. dneh enološke fermentacije s čisto kulturo *S. cerevisiae* v petih različnih gojiščih smo določili še aktivnost treh ključnih glikolitičnih encimov. V drugem delu poskusa smo se osredotočili na najbolj buren del fermentacije, ki smo ga določili glede na rezultate prvega dela poskusa. Vzorčili smo ob inokulaciji ter po 7. dneh fermentacije in izvedli enake analize kot v prvem delu poskusa.

Ugotovili smo, da nižje razmerje glukoza/fruktoza v mediju povzroči upočasnitev enološke fermentacije. Ko je v mediju višja koncentracija fruktoze, se tvori manj etanola in zato tudi manjša količina CO₂ ter manj drugih kvasnih metabolitov. Povišane koncentracije fruktoze upočasnijo kvasni metabolizem, vplivajo pa tudi na aktivnost glikolitičnih encimov. Potrebne bi bile nadaljnje raziskave, da bi lahko ugotovili dejanski vzrok upočasnjene porabe fruktoze s kvasovko *S. cerevisiae*.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani: 27-89.
- Alexandre H., Charpentier C. 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. (Review). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, 1: 20-27.
- Ansanay - Galeote V., Blondin B., Dequin S., Sablayrolles J.-M. 2001. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 23: 677-681.
- Bai F. W., Chen L. J., Zhang Z., Anderson W. A., Moo-Young M. 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *Journal of Biotechnology*, 110: 287-293.
- 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: 507-512.
- 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., Fraenkel D. G. 1983. Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS*, 80: 1730-1734.
- Bisson L. F., Butzke C. E. 2000. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations (Review). *American Journal of Enology & Viticulture*, 51, 2: 168-177.
- Blateyron L., Sablayrolles J.M. 2001. Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 2: 184-189.
- Boulton R.B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R.E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman & Hall: 134-192.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-252.
- Carlson M. 1999. Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 202-207.

- Carrasco P., Querol A., del Olmo M. 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strain. *Archives of Microbiology*, 175: 450-457.
- Ciani M., Fatichenti F. 1999. Selective sugar consumption by apiculate yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, 28, 3: 203-206.
- D'Amore T., Russell I., Stewart G. G. 1989. Sugar utilization by yeast during fermentation. *Journal of Industrial Microbiology*, 4: 315-323.
- 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.
- de Winde J. H., Crauwels M., Hohmann S., Thevelein J. M., Winderickx J., 1996. Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *European Journal of Biochemistry*, 241: 633-643.
- Dennis A. R., Rhodey M., McCammon M. T. 1999. Yeast mutants of glucose metabolism with defects in coordinate regulation of carbon assimilation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365: 279-288.
- Diderich J. A., Teusink B., Valkier J., Anjos J., Spencer-Martins I., van Dam K., Walsh M. C. 1999. Strategies to determine the extent of control exerted by glucose transport on glycolytic flux in the yeast *Saccharomyces bayanus*. *Microbiology*, 145: 3447-3454.
- Diderich J. A., Raamsdonk L. M., Kruckeberg A. L., Berden J. A., van Dam K. 2001. Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *Applied and Environmental Microbiology*, 67,4 : 1587-1593.
- Elbing K., Larsson C., Bill R. M., Albers E., Snoep J. L., Boles E., Hohmann S., Gustafsson L. 2004. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 9: 5323-5330.
- 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.
- Erasmus D. J., van der Merwe 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.
- Fleet G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food microbiology*, 86: 11-22.

- Fleet G. H., Graham G. M. 1992. Yeasts - Growth during fermentation. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G. H. (ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 27-55.
- Flood A. E., Johns M. R., White E. T. 1996. Maturation of D-fructose in aqueous-ethanolic solutions and its influence on crystallisation. *Carbohydrate Research*, 288: 45-56.
- Flores C. L., Rodriguez C., Petit T., Gancedo C. 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 507-529.
- Fugelsang K. C. 1996. Wine microbiology. New York, Chapman & Hall: 117-142.
- Gafner J., Schutz M. 1996. Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations. *Wein-Wissenschaft Viticultural and Enological Sciences*, 3, 51: 214-218.
- Goncalves P., Planta R. J. 1998. Starting up yeast glycolysis. *Trends in Microbiology*, 6, 8: 314-319.
- Henschke P. A., Jiranek V. 1992. Metabolism of nitrogen compounds. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G. H. (ur.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 77-165.
- Heijnen J. J. 2001. Stoichiometry and kinetics of microbial growth from a thermodynamic perspective. V: *Basic Biotechnology*. 2nd ed. Retledge C., Kristiansen B. (eds.), Cambridge, University Press: 45-58.
- Hofmeyr J.-H. S. 1997. Anaerobic energy metabolism in yeast as a supply-demand system. V: *New beer in an old bottle: Eduard Buchner and the growth of biochemical knowledge*. Cornish-Bowden A. (ed.), Universitat de Valencia, Valencia, Spain. <http://bip.cnrs-mrs.fr/bip10/hofmeyr.htm> (september 2005): 225-242.
- Ivorra C., Perez - Ortin J. E., del Olmo M. 1999. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in yeast. A molecular study. *Biotechnology and Bioengineering*, 6, 64: 698-708.
- Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr(VI). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 6: 316-323.
- 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: 195-210.
- Kurtzman C. P., Boekhout T., Robert V., Fell J. W., Deak T. 2003. Methods to identify yeasts. V: *Yeast in food*. Boekhout T., Robert V. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing: 69-121.

- Lalonde S., Boles E., Hellman H., Barker L., Patrick J. W., Frommer W. B., Ward J.M. 1999. The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell*, 11: 707-726.
- Larsson C., Pahlman I. L., Gustafsson L. 2000. The importance of ATP as a regulator of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16: 797-809.
- 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, 1: 25-32.
- Luyten K., Riou C., Blondin B. 2002. The hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* play different roles during enological fermentation. *Yeast*, 19: 713-726.
- Mager W. H., Siderius M. 2002. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. MiniReview. *FEMS Yeast Research*, 2: 251-257.
- Martini A. 2003. Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Microbiology*, 6: 207-209.
- McMekeen T. A., Olley J. N., Ross T., Ratkowsky D. A. 1993. Predictive microbiology: theory and application. New York, John Wiley & Sons Inc. : 340 str.
- Meijer M. M. C., Boonstra J., Verkleij A. J., Verrips C. T. 1996. Kinetic analysis of hexose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in continuous culture. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1277: 209-216.
- Naumov G. I. 1996. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology*, 17: 295-302.
- Nevoigt E., Stahl U. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 231-241.
- Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J. 2000. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 1: 34-50.
- Ozcan S., Johnston M. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cellular Biology*, 15, 3 : 1564-1572.
- Ozcan S., Dover J., Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17, 9: 2566-2573.
- Ozcan S., Johnston M. 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 3 : 554-569.

- Painting K., Kirsop B. 1989. A quick method for estimating the percentage of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. UNESCO / WFCC – Education Committee. <http://www.wfcc.info/tis/info2.html> (2.6.2005): 1 str.
- Park J.-I., Grant C. M., Dawes I. W. 2005. The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327: 311-319.
- 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.
- Perez M., Luyten K., Michel R., Riou C., Blondin B. 2005. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Research*, 5 : 351-361.
- Perez - Ortin J. E., Garcia - Martinez J., Alberola T. M. 2002. DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeast. *Journal of Biotechnology*, 98: 227-241.
- Petit T., Diderich J.A., Kruckeberg A. L., Gancedo C., van Dam K. 2000. Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 182, 23: 6815-6818.
- 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: 71-105.
- Pravilnik o spremembah in dopolnitvah pravilnika o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. PRILOGA III: Najmanjše in največje vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana na ozemlju Republike Slovenije. *Uradni list Republike Slovenije*, 14, 172: 15270-15270.
- Pretorius I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Review. Yeast*, 16: 675-729.
- Querol A., Fernandez - Espinar T., del Olmo M., Barrio E. 2003. Adaptive evolution of vine yeast (Review). *International Journal of Food Microbiology*, 86: 3-10.
- Raspor P., Smole Možina S., Čadež N. 2001. Identification of yeasts from grape/must/wine system. V: *Food microbiology protocols*. Spencer J. F. T., Ragout de Spencer A.L. (eds.). Totowa, Humana Press: 243-257.

- Ratledge C. 1987. Biochemistry of growth and metabolism. V: Basic biotechnology. Bu'lock J., Kristiansens B. (eds.). New York, Academic Press, 11-39.
- Reifenberger E., Boles E., Ciriacy M. 1997. Kinetic characterisation of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to triggering mechanisms of glucose repression. *European Journal of Biochemistry*, 245: 324-333.
- Rep M., Krantz M., Thevelein J. M., Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *Journal of Biological Chemistry*, 274,12: 8290-8300.
- Rolland F., Winderickx J., Thevelein J. M. 2002. Glucose -sensing and -signaling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2: 183-201.
- 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.
- Rotter B. 2005. The influence of pH. Improved Winemaking. <http://members.tripod.com/~BRotter/pH.htm> (25.9.2005): 1 str.
- 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.
- Sanz P., Nieto A., Prieto J. A. 1996. Glucose repression may involve processes with different sugar kinase requirements. *Journal of Bacteriology*, 178, 15 : 4721-4723.
- Schuller D., Casal M. 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 3 : 292-304
- Tamas 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.
- Teusink B., Diderich J. A., Westerhoff H. V., van Dam K., Walsh M. C. 1998. Intracellular glucose concentration in derepresses yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50 %. *Journal of Bacteriology*, 180, 3: 556-562.

- Teusink B., Passarge J., Reijenga C. A., Esgalhado E., M., van der Weijden C. C., Schepper M., Walsh M. C., Bakker B. M., van Dam K., Westerhoff H. V., Snoep J. L. 2000. Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *European Journal of Biochemistry*, 267: 5313-5329.
- Thevelein J. M., Hohmann S. 1995. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends in Biochemical Science*, 20: 3-10.
- Torija M. J., Beltran G., Novo M., Poblet M., Guillamon J. M., Mas A., Rozes N. 2003. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 127-136.
- van Dijken J. P., Weusthuis R. A., Pronk J. T. 1993. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63: 343-352.
- van Hoek., 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.
- Varela C., Pizarro F., Agosin E. 2004. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied & Environmental Microbiology*, 70, 6: 3392-3400.
- Walker G. M. 1998. Yeast metabolism. V: Yeast physiology and biotechnology. Chicester, John Wiley & Sons Ltd: 201-255.
- Walker G. M. 2000. Yeasts. V: Encyclopedia of microbiology. Vol. 4, 2nd ed. Lederberg J. (ed.). London, Academic Press: 939-953.
- Wurster B., Hess B., Koerner T. A. W., Voll R. J., Younathan E. S. 1975. Tautomeric and anomeric specificity of allosteric activation of yeast pyruvate kinase by D-fructose 1,6-bisphosphate and its relevance in D-glucose catabolism. *FEBS Letters*, 63, 1:17-21.
- Yalcin K. S., Ozbas Z. Y. 2004. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Narince 3. *Process Biochemistry*, 39: 1285-1291.
- Yamaji K., Hara S., Mizoguchi H. 2003. Influence of Ras function in ethanol stress response of sake yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96,5: 474-480.

- Yin Z., Wilson S., Hauser N. C., Tournu H., Hoheisel J., Brown A. J. P. 2003. Glucose triggers different global responses in yeast, depending on the strength of the signal, and transiently stabilized ribosomal protein mRNAs. *Molecular Microbiology*, 48, 3: 713-724.
- Ye L., Kruckeberg A. L., Berden J. A., van Dam K. 1999. Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *Journal of Bacteriology*, 181, 15: 4673-4675.
- Zuzuarregui A., del Olmo M. 2004. Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behaviour. *FEMS Yeast Research*, 4: 699-710.

ZAHVALA

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

Hvala Janji Klinčar za pomoč pri vodenju eksperimentalnega dela in izdelavi 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.

Velika zahvala mami, očetu in sestri za podporo tekom študija.

Martina in Dušan hvala za prijateljstvo, vse kavice in potrpežljivost.....

Hvala mojim sončkom. Rada vas imam!

PRILOGE

Priloga A1: Sestava kemijsko definirane mošta (CDM) (modificiran po Henschke in Jiranek, 1992).

KEMIKALIJA	Proizvajalec	MASA (g/1000 ml)
Glukoza	Kemika	400;300;200;100 oz. 0
Fruktoza	Merck	400;300;200;100 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	0,000032
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 xHCl	Aldrich	0,0005
P-amino benzojeva ksl.	/	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

Vitamine in minerale smo pripravili v založnih raztopinah (Prilogi A1 in A2), ostale kemikalije pa smo zatehtali v merilno bučko ob pripravi gojišča.

Priloga A2: Protokol za pripravo založnih raztopin mineralov.

KEMIKALIJA	PRIPRAVA	KONC. 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. Dodali smo 100 µl založne raztopine posameznega minerala za 1 liter kemijsko definiranega mošta.

Priloga A3: Protokol za pripravo založne raztopine vitaminov.

KEMIKALIJA	PRIPRAVA	KONC. 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 xHCl	0,05 g v 100 ml destilirane vode	0,5
P-amino benzojeva ksl.	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

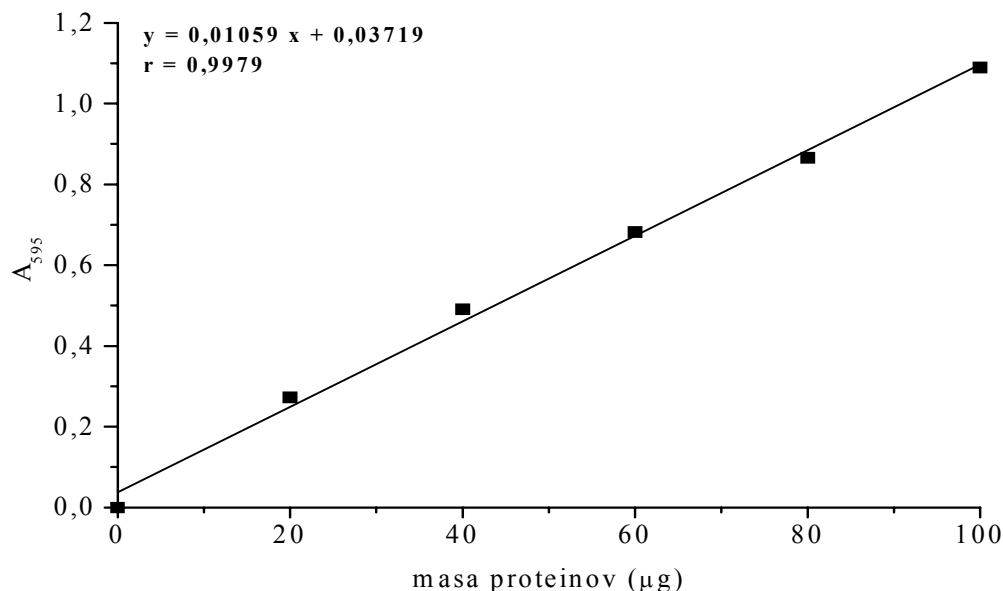
Opomba: Založno raztopino mineralov smo pripravili skupaj v eni raztopini. Dodali smo 1 ml založne raztopine vitaminov za 1 liter kemijsko definiranega mošta.

Priloga B: Razmerja glukoze in fruktoze v posameznem kemijsko definiranem gojišču (CDM) (osenčeno).

		Glukoza (g/l)				
		0	100	200	300	400
Fruktoza (g/l)	400	A				
	300		B			
	200			C		
	100				D	
	0					E

Opomba: Gojišča smo pripravili v treh ponovitvah (= 15 fermentorjev). Pri drugem delu poskusa smo uporabili le gojišča A, C in E.

Priloga C: Umeritvena krivulja za določanje proteinov po Bradford-u. Maso proteinov predstavljajo znane koncentracije BSA.



Priloga D: Zadrževalni časi glukoze, fruktoze in zunajceličnih metabolitov na koloni Aminex (BioRad).

Spojina	Čas zadrževanja (min)	Detektor
glukoza	9,83	RI
fruktoza	10,16	RI
glicerol	13,58	RI
etanol	20,37	RI
ocetna kislina	15,08	UV/VIS

Priloga E: Podatki za rastno krivuljo *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 1927. Podana so povprečja treh neodvisnih gojitev (aerobna submerzna kultura na stresalniku, 26 ur, 200vrt./min, 28 °C).

čas(ure)	OD ₆₅₀			povprečje	SD	KV (%)
	A	B	C			
0	0,227	0,213	0,225	0,222	0,01	3,42
2	0,264	0,245	0,216	0,242	0,02	10,00
4	0,51	0,48	0,472	0,487	0,02	4,11
6	0,85	0,932	0,85	0,877	0,05	5,40
8	1,098	1,253	1,17	1,174	0,08	6,61
10	1,205	1,534	1,332	1,357	0,17	12,23
12	1,226	1,554	1,357	1,379	0,17	11,97
14	1,188	1,638	1,498	1,441	0,23	15,98
26	1,442	1,672	1,685	1,600	0,14	8,55

Priloga F1: Poraba glukoze in fruktoze, tvorba etanola, glicerola in očetne kisline (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Konc. glc/fru(g/l)	Potek fermentacije (dan)												
	0	2	6	9	13	16	20	24	28	31	35	38	42
Glukoza													
400/0	409,66	397,41	345,20	285,90	267,93	242,28	196,33	177,10	166,38	148,53	147,29	137,84	134,84
300/100	313,05	299,10	248,37	206,68	189,80	156,61	134,20	123,55	110,95	100,31	90,55	80,91	71,80
200/200	193,78	176,78	158,61	121,34	110,60	90,88	72,51	60,77	52,06	45,21	39,31	32,77	20,43
100/300	103,13	97,01	70,74	56,81	42,56	43,35	26,12	21,61	16,69	12,02	10,33	10,81	6,83
0/400	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fruktoza													
400/0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
300/100	104,45	103,18	96,13	89,85	90,50	75,49	71,71	74,43	70,65	68,77	67,06	66,81	65,99
200/200	182,77	174,09	177,19	151,17	153,98	132,90	128,24	121,83	116,92	111,31	108,85	100,97	96,94
100/300	278,84	273,75	239,80	221,22	206,95	179,30	171,14	166,74	152,96	129,81	134,89	128,70	128,25
0/400	347,55	318,35	292,20	275,37	254,70	199,60	203,74	202,34	187,06	172,78	153,12	152,33	142,98
Etanol													
400/0	0,00	2,75	32,36	45,68	63,13	71,89	74,92	78,73	88,43	88,11	100,41	103,49	104,29
300/100	0,00	2,66	29,13	44,13	62,05	65,99	73,01	80,32	88,33	92,54	99,88	100,88	102,37
200/200	0,00	3,11	28,32	38,68	59,81	66,75	71,21	76,84	86,35	91,05	93,21	94,43	99,43
100/300	0,00	3,66	29,27	43,85	57,10	65,40	70,80	77,23	84,29	83,20	95,15	91,57	95,00
0/400	0,00	3,04	26,10	38,78	50,36	50,50	55,16	69,72	75,12	80,13	83,49	86,86	92,92
Glicerol													
400/0	0,00	0,00	4,63	5,52	6,72	7,01	7,27	6,73	7,31	7,17	7,98	8,18	8,56
300/100	0,00	0,00	4,53	5,35	7,04	6,90	7,29	7,31	7,70	7,91	8,30	8,26	8,32
200/200	0,00	0,00	4,31	5,14	6,76	6,85	6,24	6,71	7,23	6,84	8,05	7,97	7,85
100/300	0,00	0,00	4,67	5,91	6,61	6,78	6,79	7,05	7,38	6,84	7,93	7,56	8,25
0/400	0,00	0,00	4,22	5,21	5,86	5,44	5,70	6,20	6,25	6,66	6,46	6,69	7,01
Očetna ksl.													
400/0	0,00	0,00	1,04	1,21	1,41	1,79	1,63	2,27	2,33	2,32	2,40	2,32	1,60
300/100	0,00	0,00	1,02	1,31	1,53	1,84	2,36	2,42	2,50	2,45	2,44	2,77	1,42
200/200	0,00	0,00	0,97	1,10	1,39	1,48	2,41	2,23	2,46	2,34	2,29	2,39	1,28
100/300	0,00	0,00	1,07	1,30	1,54	1,64	1,56	2,37	2,42	2,67	2,48	2,28	1,51
0/400	0,00	0,00	1,07	1,18	1,43	1,38	1,37	1,53	1,94	1,99	2,31	2,43	1,27

Priloga F2: Poraba glukoze (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

		Potek fermentacije (dan)							
		0		2		6		9	
Konc.glc/fru (g/l)		Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0		409,66±5,87	1,43	397,41±10,24	2,58	345,20±14,02	4,06	285,90±30,42	10,64
300/100		313,05±24,18	7,72	299,10 ± 3,69	1,23	248,37± 9,34	3,76	206,68±12,80	6,19
200/200		193,78±8,20	4,23	176,78±14,15	8,00	158,61 ± 0,93	0,60	121,34±18,04	14,87
100/300		103,13±3,33	3,23	97,01±3,42	3,52	70,74 ± 4,25	6,00	56,81± 0,81	1,43
		Potek fermentacije (dan)							
		13		16		20		24	
Konc.glc/fru (g/l)		Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0		267,93±10,00	3,73	242,28 ±11,1	4,58	196,33±20,68	10,53	177,10±15,54	8,77
300/100		189,80±10,54	5,55	156,61±10,83	6,91	134,20 ± 4,10	3,06	123,55 ± 2,15	1,74
200/200		110,60 ± 0,44	0,40	90,88 ± 7,22	7,94	72,51± 1,49	2,06	60,77 ± 1,07	1,76
100/300		42,56 ± 8,93	20,97	43,35 ± 13,17	30,39	26,12 ± 3,11	11,92	21,61 ± 4,21	19,48
		Potek fermentacije (dan)							
		28		31		35		38	
Konc.glc/fru (g/l)		Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0		166,38±5,02	3,02	148,53±9,37	6,31	147,29±4,44	3,02	137,84±3,38	2,45
300/100		110,95±4,56	4,11	100,31±1,81	1,81	90,55±1,14	1,26	80,91± 0,81	1,01
200/200		52,06 ± 1,91	3,67	45,21± 3,05	6,75	39,31±1,84	4,68	32,77± 4,53	13,83
100/300		16,69 ± 0,32	1,92	12,02 ± 5,08	42,2	10,33±1,49	14,39	10,81±1,93	17,84
		Potek fermentacije (dan)							
		42							
Konc.glc/fru (g/l)		Povpr.±SD	KV (%)						
400/0		134,84±3,31	2,45						
300/100		71,80 ± 6,11	8,51						
200/200		20,43± 7,98	39,04						
100/300		6,83 ± 2,56	37,48						

Priloga F3: Poraba fruktoze (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

		Potek fermentacije (dan)							
		0		2		6		9	
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	
300/100	104,45±8,18	7,83	103,18±1,76	1,70	96,13±3,20	3,33	89,85±0,74	0,83	
200/200	182,77±7,76	4,25	174,09±13,86	7,96	177,19±1,26	0,71	151,17±20,79	13,75	
100/300	278,84±9,63	3,45	273,75±11,22	4,10	239,80±7,61	3,17	221,22±9,69	4,38	
0/400	347,55±12,34	3,56	318,35±31,55	9,91	292,20±9,46	3,24	275,37±4,78	1,73	
		Potek fermentacije (dan)							
		13		16		20		24	
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	
300/100	90,50±1,19	1,31	75,49±3,95	5,24	71,71±6,54	9,12	74,43±3,24	4,36	
200/200	153,98±2,73	1,77	132,90±14,69	11,05	128,24±0,47	0,36	121,83±1,14	0,93	
100/300	206,95±14,08	6,80	170,46±37,28	21,87	171,14±7,18	4,20	166,74±17,44	10,46	
0/400	254,70±5,59	2,19	199,60±7,03	7,03	203,74±9,94	4,88	202,34±5,79	2,86	
		Potek fermentacije (dan)							
		28		31		35		38	
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	
300/100	70,65±1,88	2,66	68,77±0,82	1,18	67,06±0,53	0,79	66,81±0,89	1,33	
200/200	116,92±3,12	2,67	111,31±3,65	3,28	108,85±2,29	2,10	100,97±12,54	12,42	
100/300	152,96±8,40	5,49	129,81±28,45	21,92	134,89±1,41	1,04	128,70±9,16	7,12	
0/400	187,06±6,70	3,58	172,78±11,28	6,53	153,12±11,84	7,73	152,33±7,12	4,67	
		Potek fermentacije (dan)							
		42							
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)							
300/100	65,99±0,18	0,27							
200/200	96,94±3,65	3,76							
100/300	128,25±1,22	0,95							
0/400	142,98±9,37	6,55							

Priloga F4: Tvorba etanola (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Potek fermentacije (dan)								
	2		6		9		13	
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0	2,75±0,18	6,52	32,36±2,65	8,20	45,68±5,23	11,46	63,13±4,99	7,91
300/100	2,66±0,35	13,27	29,13±0,93	3,18	44,13±2,82	6,38	62,05±1,94	3,12
200/200	3,11±0,33	10,60	28,32±1,04	3,68	38,68±6,05	15,64	59,81±3,44	5,75
100/300	3,66±1,16	9,82	29,27±3,42	11,69	43,85±7,66	17,46	57,10±2,76	4,84
0/400	3,04±0,56	13,57	62,78±1,67	2,67	38,78±1,50	3,87	50,36±1,77	3,52
Potek fermentacije (dan)								
	16		20		24		28	
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0	71,89±4,20	5,85	74,92±11,05	14,75	78,73±2,73	3,47	88,43±3,67	4,15
300/100	65,99±4,52	6,85	73,01±1,56	2,14	80,32±0,84	1,04	88,33±2,11	2,39
200/200	66,75±8,93	13,38	71,21±2,54	3,57	76,84±3,50	4,55	86,35±3,05	3,53
100/300	74,30±24,42	32,87	65,26±10,10	15,47	77,23±5,47	7,09	84,29±13,38	15,87
0/400	50,50±2,90	5,75	55,16±4,68	8,48	69,72±0,11	0,15	75,12±2,39	3,18
Potek fermentacije (dan)								
	31		35		38		42	
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0	88,11±8,83	10,02	100,41±3,98	3,97	103,49±2,97	2,87	104,29±1,41	1,36
300/100	92,54±1,85	2,00	99,88±2,55	2,55	100,88±4,21	4,17	102,37±7,98	7,80
200/200	91,05±1,41	1,55	93,21±3,78	3,73	94,43±12,88	13,64	85,57±29,69	34,69
100/300	78,03±9,90	12,68	95,15±11,07	11,64	91,57±7,03	7,68	99,43±7,63	7,67
0/400	80,13±7,28	9,08	83,49±7,76	9,29	86,86±3,63	4,18	92,92±4,95	5,32

Priloga F5: Tvorba glicerola (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

Potek fermentacije (dan)								
	6		9		13		16	
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0	4,63±0,29	6,20	5,52±0,62	11,24	6,72±0,37	5,45	7,01±0,31	4,39
300/100	4,53±0,07	1,62	5,35±0,96	17,85	7,04±0,13	1,79	6,90±0,47	6,87
200/200	4,31±0,14	3,31	5,14±0,87	16,85	6,76±0,40	5,96	6,85±0,88	12,90
100/300	4,67±0,37	7,84	5,91±0,73	12,31	6,61±0,20	3,02	6,78±0,64	9,48
0/400	4,22±0,15	3,60	5,21±0,09	1,80	5,86±0,14	2,36	5,44±0,46	8,42
Potek fermentacije (dan)								
	20		24		28		31	
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0	7,27±0,94	12,99	6,73±0,31	4,67	7,31±0,07	1,02	7,17±0,95	8,27
300/100	7,29±0,46	6,30	7,31±0,28	3,87	7,70±0,32	4,13	7,91±0,21	2,69
200/200	6,24±1,73	27,74	6,71±0,35	5,19	7,23±0,32	4,42	6,84±0,09	1,31
100/300	6,79±1,05	15,41	7,05±0,46	6,54	7,38±0,97	13,16	6,84±0,42	6,15
0/400	5,70±0,63	11,11	6,20±0,76	12,25	6,25±0,33	5,35	6,66±0,20	2,99
Potek fermentacije (dan)								
	35		38		42			
Konc.glc/fru (g/l)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)		
400/0	7,98±0,06	0,71	8,18±0,16	1,93	8,56±0,07	0,86		
300/100	8,30±0,18	2,22	8,26±0,25	3,01	8,32±0,81	9,74		
200/200	8,05±0,33	4,04	7,97±0,09	1,10	7,85±0,26	3,31		
100/300	7,93±0,64	8,13	7,56±0,37	4,83	8,25±0,66	8,06		
0/400	6,46±0,50	7,74	6,69±0,32	4,79	7,01±0,56	7,92		

Priloga F6: Tvorba oetne kisline (g/l) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza; podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%). Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

		Potek fermentacije (dan)							
		6		9		13		16	
Konc.glc/fru (g/l)		Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0		1,04±0,03	2,44	1,21±0,14	11,96	1,41±0,06	4,37	1,79±0,42	23,66
300/100		1,02±0,01	0,77	1,31±0,04	3,26	1,53±0,08	5,28	1,84±0,61	33,42
200/200		0,97±0,04	4,28	1,10±0,18	16,66	1,39±0,07	5,28	1,48±0,18	12,05
100/300		1,07±0,07	5,48	1,30±0,17	12,74	1,54±0,07	4,82	1,64±0,50	23,46
0/400		0,98±0,05	6,67	1,18±0,01	1,23	1,43±0,03	1,89	1,38±0,19	13,78
		Potek fermentacije (dan)							
		20		24		28		31	
Konc.glc/fru (g/l)		Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)
400/0		1,63±0,44	26,69	2,27±0,22	9,80	2,33±0,03	1,48	2,32±0,47	20,10
300/100		2,36±0,09	3,93	2,42±0,18	7,53	2,50±0,23	9,01	2,45±0,23	9,22
200/200		2,41±0,07	2,76	2,23±0,11	4,86	2,46±0,27	11,02	2,34±0,34	14,55
100/300		1,56±0,94	60,18	2,37±0,24	10,34	2,42±0,25	10,23	2,67±0,25	9,42
0/400		1,37±0,11	8,16	1,53±0,19	12,55	1,94±0,52	27,94	1,99±0,44	21,97
		Potek fermentacije (dan)							
		35		38		42			
Konc.glc/fru (g/l)		Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)	Povpr.±SD	KV (%)		
400/0		2,40±0,05	2,11	2,32±0,19	8,07	1,60±0,08	4,74		
300/100		2,44±0,22	8,89	2,77±0,26	9,37	1,42±0,12	8,50		
200/200		2,29±0,12	5,05	2,39±0,13	5,46	1,28±0,08	6,07		
100/300		2,48±0,16	6,46	2,28±0,10	4,46	1,51±0,17	11,33		
0/400		2,31±0,15	6,46	2,43±0,24	9,97	1,27±0,06	4,90		

Priloga F7: Spreminjanje vrednosti pH medija med alkoholno fermentacijo. Rezultati so povprečje treh neodvisnih gojitev.

		Potek fermentacije (dan)												
Konc. glc/fru (g/l)		0	2	6	9	13	16	20	24	28	31	35	38	42
400/0		3,534	3,493	3,514	3,550	3,599	3,579	3,629	3,680	3,710	3,743	3,772	3,706	3,728
300/100		3,473	3,441	3,471	3,507	3,556	3,538	3,580	3,634	3,662	3,695	3,716	3,645	3,671
200/200		3,508	3,474	3,502	3,535	3,583	3,578	3,613	3,652	3,695	3,729	3,752	3,680	3,706
100/300		3,500	3,486	3,503	3,532	3,575	3,578	3,603	3,657	3,689	3,714	3,741	3,666	3,684
0/400		3,500	3,471	3,501	3,518	3,551	3,563	3,567	3,620	3,648	3,670	3,696	3,618	3,642

Priloga F8: Tvorba CO₂ (g) in dCO₂/dt (g/l/dan) med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem glukoza/fruktoza. Rezultati so povprečne vrednosti treh neodvisnih gojitev.

CO ₂ (g) Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	Potek fermentacije (dan)												
	0	2	6	9	13	16	20	24	28	31	35	38	42
400/0	0,0	1,0	30,0	45,7	59,0	66,7	75,7	82,3	90,0	95,7	101,7	105,3	109,3
300/100	0,0	2,7	27,0	42,7	51,3	59,0	68,0	75,0	83,0	89,3	97,0	102,0	106,3
200/200	0,0	0,0	23,3	39,3	46,7	55,0	65,0	73,3	82,0	88,0	95,0	99,7	104,0
100/300	0,0	0,7	27,0	42,7	50,0	57,7	66,7	74,0	82,0	88,0	94,7	99,3	103,7
0/400	0,0	0,7	21,7	34,3	42,7	49,3	57,3	64,0	72,0	78,0	85,7	91,7	97,7
dCO ₂ /dt (g/l/dan)	0	2	6	9	13	16	20	24	28	31	35	38	42
400/0	0,0	0,5	5,0	5,1	4,5	4,2	3,8	3,4	3,2	3,1	2,9	2,8	2,6
300/100	0,0	1,3	4,5	4,7	3,9	3,7	3,4	3,1	3,0	2,9	2,8	2,7	2,5
200/200	0,0	0,0	3,9	4,4	3,6	3,4	3,3	3,1	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5
100/300	0,0	0,3	4,5	4,7	3,8	3,6	3,3	3,1	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5
0/400	0,0	0,3	3,6	3,8	3,3	3,1	2,9	2,7	2,6	2,5	2,4	2,4	2,3

Priloga G: Poraba glukoze in fruktoze (g/l) po 7. dneh alkoholne fermentacije s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* v CDM gojiščih z različnim začetnim razmerjem sladkorjev. Podane so povprečne vrednosti, SD in KV(%), glede na tri neodvisne gojitve v posameznem gojišču.

Glukoza (g/l) Konc. glc/fru v gojišču (g/l)	t ₀			t ₇		
	povpr.	SD	KV(%)	povpr.	SD	KV(%)
400/0	391,17	7,78	1,99	250,90	19,74	7,87
200/200	188,98	11,38	6,02	136,36	2,08	1,52
0/400	/	/	/	/	/	/
Fruktoza (g/l)	povpr.	SD	KV(%)	povpr.	SD	KV(%)
400/0	/	/	/	/	/	/
200/200	201,11	1,41	0,70	152,24	2,60	1,70
0/400	347,55	8,88	2,55	277,42	12,72	4,59