



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Rok BAJC

**METABOLIZEM FENOLNIH SPOJIN V  
PIVOVARSKIH KVASOVKAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Rok BAJC

**METABOLIZEM FENOLNIH SPOJIN V PIVOVARSKIH  
KVASOVKAH**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**METABOLISM OF PHENOLIC COMPOUNDS BY BREWER'S  
YEAST**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2020

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Nežo Čadež, za somentorja pa dr. Miha Tometa.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Neža ČADEŽ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Miha TOME  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Datum predavitve: 2.9.2020

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 663.4:543.92:602.3:582.282.23:602.42:577.152.3(043.2)
KG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , pivovarstvo, fenoli, metabolizem, evolucija
AV	Bajc, Rok
SA	ČADEŽ, Neža (mentorica), TOME, Miha (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2020
IN	METABOLIZEM FENOLNIH SPOJIN V PIVOVARSKIH KVASOVKAH
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 21 str., 2 pregl., 5 sl., 58 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Fenolne spojine spadajo med najpomembnejše senzorično zaznavne molekule v pivu, njihova vsebnost se giblje med 500 in 1000 mg/L in je sestavljena iz različnih skupin. 70-80 % fenolnih spojin izvira iz sladu, približno 20-30% pa jih v pivo prispeva hmelj. Med fermentacijo je večina teh spojin podvrženih biotransformaciji. Pri pivovarskih kvasovkah je podrobneje raziskana encimatska pretvorba hlapnih fenolov. Večinoma gre za pretvorbo hidroksicimetnih kislin, kot sta ferulna in <i>p</i> -kumarna kislina, v 4-vinil gvajakol in 4-vinil fenol. V pivovarskih kvasovkah je pretvorba katalizirana z dekarboksilazo ferulne kisline (Fdc1) in dekarboksilazo fenilakrilnih kislin (Pad1). Poleg hidroksicimetnih kislin se v pivu nahajajo tudi druge fenolne spojine, kot so enostavni fenoli, derivati benzojske kisline, kumarini, katehini, di-, tri- in oligomerni proantocianidini, halkoni ter flavonoidi. Nekatere med njimi so v relativno visokih koncentracijah; fenol tirozol, <i>p</i> -hidroksibenzojska kislina, vanilinska kislina, vanilin, katehin in epikatehin, proantocianidni dimeri in flavanon izoksantohumol. Cilj diplomskega dela je spoznati proces fermentacije in sestavo piva, razumeti evolucijo in evolucijske razlike med pivovarskimi sevi kvasovk in kako te vplivajo na metabolizem fenolnih spojin ter spoznati pristope, s katerimi izboljšujemo industrijske seve kvasovk.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDK 663.4:543.92:602.3:582.282.23:602.42:577.152.3(043.2)

CX *Saccharomyces cerevisiae*, beer brewing, phenols, metabolism, evolution

AU Bajc, Rok

AA ČADEŽ, Neža (supervisor), TOME, Miha (co-advisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2020

TI METABOLISM OF PHENOLIC COMPOUNDS BY BREWER'S YEAST

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VIII, 21 p., 2 tab., 5 fig., 58 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Phenolic compounds are among of the most important flavor and aroma molecules in beer, where their concentration ranges from 500 to 1000 mg/L, and is made of several different phenol groups. 70-80% of phenolic compounds are derived from malt and 20-30% are derived from hops. During the process of fermentation they are susceptible to biotransformation. Among the brewing yeast the enzymatic transformation of volatile phenols is researched more into detail. It mainly refers to the transformation of hydroxycinnamic acids, e.g. transformation of ferulic and p-cumaric acid, to 4-vinylguaiacol and 4-vinylphenol. Transformation is catalysed by ferulic acid decarboxylase (FDC1) and phenylacrylic acid decarboxylase (PAD1). Besides hydroxycinnamic acids, other phenolic compounds like simple phenols, benzoic acid derivatives, coumarins, proanthocyanidins, chalcones and flavonoids, can be found in beer. Some of those are present in relatively high concentrations, e.g. tyrosol, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, vanillin, catechin and epicatechin, dimers of proanthocyanidin and isoxanthohumol. The goal of this thesis is to understand the process of beer fermentation, beer composition, the evolution and evolutionary differences between different yeast strains, their role in metabolism of phenolic compounds and also get to know the techniques that help us improve the industrial yeast strains.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 FENOLNE SPOJINE V PIVU</b>	<b>1</b>
2.1 PIVOVARSTVO	<b>1</b>
<b>2.1.1 Pivovarske sestavine</b>	<b>1</b>
2.1.1.1 Voda	2
2.1.1.2 Slad in slajenje	2
2.1.1.3 Hmelj	2
2.1.1.4 Kvasovke	3
<b>2.1.2 Proces varjenja piva</b>	<b>3</b>
2.1.2.1 Drozganje in varjenje	3
2.1.2.2 Fermentacija in zorenje	3
<b>3 FENOLNE SPOJINE V PIVU</b>	<b>4</b>
3.1 HIDROKSICIMETNE KISLINE	5
<b>4 METABOLIZEM HIDROKSICIMETNIH KISLIN</b>	<b>5</b>
4.1 ORGANOLEPTIČNE LASTNOSTI HIDROKSICIMETNIH KISLIN IN NJIHOVIH DERIVATOV	5
4.2 IZVOR HIDROKSICIMETNIH KISLIN V PIVU	6
<b>4.2.1 Hidroksicimetne kisline v sladu</b>	<b>7</b>
<b>4.2.2 Hidroksicimetne kisline v hmelju</b>	<b>7</b>
4.3 TRANSFORMACIJA HIDROKSICIMETNIH KISLIN V PIVINI IN PIVU	8
<b>4.3.1 Termična dekarboksilacija</b>	<b>8</b>
<b>4.3.2 Encimatska dekarboksilacija hidroksicimetnih kislin v vinilne derivate</b>	<b>8</b>
4.3.2.1 Vinilfenol reduktaza kvasovk rodu <i>Brettanomyces</i>	9
<b>5 EVOLUCIJA IN UDOMAČITEV PIVOVARSKIH KVASOVK</b>	<b>9</b>
5.1 DEFINICIJA UDOMAČITVE	10

5.2	GEOGRAFSKI IZVORI UDOMAČENIH SEVOV <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
5.3	UDOMAČITEV <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
5.4	SELEKCIJA INDUSTRIJSKIH SEVOV <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
<b>5.4.1</b>	<b>Metabolizem maltotrioze</b>	13
<b>5.4.2</b>	<b>Evolucija genov <i>PADI</i> in <i>FDC1</i> in metabolizma hidroksicimetnih kislin</b>	13
5.5	IZBOLJŠAVE SEVOV PIVOVARSKIH KVASOVK	14
<b>5.5.1</b>	<b>Strategije razvoja pivovarskih kvasovk</b>	14
5.5.1.1	Hibridizacija	14
5.5.1.2	Mutageneza	15
5.5.1.3	Citodukcija	15
5.5.1.4	Usmerjena evolucija	15
5.5.1.5	Gensko inženirstvo	16
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČEK</b>	<b>16</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>17</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Minimalna koncentracija hlapnih fenolov v pivu za organoleptično zaznavo (Callemien in Collin, 2009)	6
Preglednica 2: Organoleptični opis najpogostejših hlapnih fenolov v pivu in njihov izvor (Michael, 2018)	6

## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Shematski prikaz sinteznih poti hidroksicimetnih kislin (Taofiq in sod., 2017)	5
Slika 2: Struktura hidroksicimetnih kislin (Lentz, 2018)	7
Slika 3: Metabolizem ferulne kisline (Lentz, 2018)	8
Slika 4: Metabolizem <i>p</i> -kumarne kisline (Steensels in sod., 2015)	8
Slika 5: Prikaz filogenije in evolucijskih sprememb udomačenih družin kvasovk (Gallone in sod., 2016)	11



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DNK	deoksiribonukleinska kislina
Fdc	dekarboksilaza ferulne kisline
Pad	dekarboksilaza fenolnih kislin
POF	ang. »phenolic off flavor«, sposobnost tvorbe hlapnih fenolov, fenotip POF
Vpr	vinilfenol reduktaza

## 1 UVOD

Pivo je ena najbolj priljubljenih alkoholnih pijač na svetu, pivovarstvo pa je globalna industrijska panoga. V zadnjih desetletjih se sicer beleži rast butičnega pivovarstva in butičnih pivovarn, vendar še vedno večino piva proizvedejo pivovarske multinacionalke. V svetu se še vedno spiije največ svetlega piva spodnjega vrenja oziroma tako imenovanega svetlega ležaka. Vseeno pa se z rastjo butičnega pivovarstva na trgu pojavlja široka izbira različnih stilov piva, nekateri izmed njih se po skorajšnjem izumrtju zopet variijo. V današnjem času so tehnologije proizvodnje ječmenovega sladu in hmelja zelo napredne, kvaliteta sladu in hmelja pa je na zelo visokem nivoju. Ker pa osrednji del pivovarske zgodbe predstavljajo prav kvasovke in so tako najpomembnejša sestavina piva, saj omogočajo nastanek najrazličnejših senzoričnih lastnosti v njem, je pomembno, da se kvasovke ter proces fermentacije čim boljše razume. Le z razumevanjem genetike in metabolizma kvasovk lahko naredimo korak naprej pri izboljšavah in odkrivanju novih sevov pivovarskih kvasovk. To vodi v predvidljivejši proces fermentacije, večjo ponovljivost proizvodnje ter nastanek novih stilov oziroma okusov piva. Zmanjša se tudi možnost nastanka nezaželenih senzoričnih lastnosti. Med molekule, ki dajejo pivu značilno aromo in okus, spadajo tudi fenolne spojine.

Med fermentacijo je mnogo fenolnih spojin podvrženih metabolnim spremembam, tako nastajajo njihovi derivati, ki so prav tako pomembni s senzoričnega vidika. Cilj tega diplomskega dela je razumevanje procesa fermentacije in sestave piva, razumeti evolucionске razlike med pivovarskimi sevi kvasovk in kako te razlike vplivajo na metabolizem fenolnih spojin ter spoznati pristope, s katerimi lahko odkrivamo nove seve kvasovk in jih izboljšujemo.

## 2 FENOLNE SPOJINE V PIVU

### 2.1 PIVOVARSTVO

Pivovarstvo človeštvo spremlja že od neolitske dobe (Meusdoerffer, 2009), v najpreprostejši obliki verjetno predstavlja prvi biotehnoški proces, ki se ga je lotil človek. Od samih začetkov pa je v procesu varjenja piva prišlo do mnogih sprememb. Izboljšal se je sam tehnološki proces varjenja, izboljšale so se tehnologije in tehnike pridobivanja pivovarskih sestavin. Ne glede na vse spremembe pa proizvodnja piva nikoli ni obstajala ločeno od kvasovk. V 19. stoletju je prišlo do uporabe čistih kvasnih kultur (Lodolo in sod., 2008).

#### 2.1.1 Pivovarske sestavine

Tehnologija varjenja je v današnjem času tehnološko precej izpopolnjena, vendar se pivovarji še vedno držijo določenih načel tradicije. Osnovne sestavine, iz katerih je pivo proizvedeno, so (kot veleval nemški zakon o čistoti, tako imenovani Reinheitsgebot) voda, slad, hmelj in kvasovke (Wunderlich in Back, 2009).

#### 2.1.1.1 Voda

Voda, ki se uporablja za varjenje piva, mora biti pitna, čista, ustrezati mora kemijskim in mikrobiološkim parametrom. Med varjenjem je zelo pomemben pH vode, saj vpliva na potek posameznih korakov, kar ima pomemben vpliv na delovanje encimov. Predvsem je pomembna vsebnost ionov v vodi.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  in bikarbonatni ioni skupaj s fosfati iz sladu vplivajo na pH vrednost drozge (Wunderlich in Back, 2009).

#### 2.1.1.2 Slad in slajenje

Za varjenje piva se največkrat oziroma v največji količini uporablja slad, ki je produkt slajenja ječmena (*Hordeum vulgare*). Poleg ječmenovega sladu se v pivovarstvu uporabljajo tudi slajena in neslajena pšenica, oves, pira, ajda itd., vendar je njihova količina v drozgi skoraj vedno manjša od količine ječmenovega sladu (Wunderlich in Back, 2009).

Škrob je najpomembnejša sestavina, ki se nahaja znotraj ječmenovih zrn, saj njegova encimatska razgradnja omogoča nastanek enostavnejših sladkorjev, ki predstavljajo kvasovkam med fermentacijo vir ogljika. Pivovarske kvasovke namreč lahko fermentirajo le nižje sladkorje, ki vsebujejo do tri monomerne enote (glukoza, fruktoza, maltoza, saharoza, maltotrioza) (Maris in sod., 2006; Zastrow in sod., 2001).

Ječmen, ki se uporablja za pivovarstvo, mora najprej skozi postopek slajenja. Pri slajenju gre za kontrolirano kaljenje ječmenovih zrn, med postopkom namreč pride do aktivacije encimov znotraj zrna. Med slajenjem mora priti do zadostne aktivacije encimov v endospermu. Proces je sestavljen iz treh faz. Prva faza je namakanje, kjer pride do hidracije ječmenovih zrn, kar vzpodbudi kaljenje. To aktivira določene encime in sproži sintezo novih encimov, ki lahko hidrolizirajo škrob v fermentabilne sladkorje. Najpomembnejši encimi, ki se aktivirajo, so amilaze. Faza kaljenja mora biti zaustavljena, saj bi v nasprotnem primeru ves škrob razpadel. Sledi torej tretja faza, pri kateri se zrna na začetku kaljenja ponovno izsuši, se jih termično obdela, kar ustavi encimsko dejavnost in kaljenje (Wunderlich in Back, 2009).

#### 2.1.1.3 Hmelj

Za varjenje piva se uporablja hmeljne storžke, ki jih najdemo na ženskih rastlinah hmelja (*Humulus lupulus*). Storžki v sredici vsebujejo  $\alpha$ -kislino in eterična olja, ki jih producirajo lupulinske žleze. Med vrenjem pivine prihaja do izomerizacije  $\alpha$ -kislina, pri čemer se pretvorijo v izo- $\alpha$ -kislino, slednje pa zaznavamo kot grenčico. Hmelj se v pivovarstvu uporablja v več oblikah. Lahko uporabljamo posušene storžke, največkrat pa se uporablja v obliki peletov, ki so dobavljivi v različnih oblikah, v zadnjem času pa se uporablja tudi razne hmeljne ekstrakte (Wunderlich in Back, 2009).

#### 2.1.1.4 Kvasovke

V pivovarstvu se v veliki večini uporabljajo kvasovke zgornjega vrenja (*Saccharomyces cerevisiae*) in kvasovke spodnjega vrenja (*Saccharomyces pastorianus*). Glavna razlika med njimi je temperaturni optimum fermentacije. Fermentacija s *Saccharomyces pastorianus* in proizvodnja ležakov največkrat potekata v temperaturnem območju med 8–14°C, fermentacija s *Saccharomyces cerevisiae* pa v temperaturnem območju med 15–26°C. Kvasovke gredo na začetku skozi aerobno fazo, v kateri se povečuje njihovo število z nespolnim razmnoževanjem, zatem pa nastopi anaerobna faza oziroma faza fermentacije, pri kateri pride preko glikolize do produkcije etanola in ogljikovega dioksida. Poleg tega kvasovke v pivo tekom fermentacije prispevajo še mnogo drugih senzorično pomembnih spojin. Produkcija teh spojin se med posameznimi sevi lahko precej razlikuje, kar vodi v širok spekter organoleptičnih lastnosti piva (Wunderlich in Back, 2009).

### 2.1.2 Proces varjenja piva

Proces varjenja piva je sestavljen in petih glavnih korakov. Prvi izmed njih je mletje sladu, pri katerem slad zmeljemo do te mere, da zdrobimo ječmenovo lupino in izpostavimo endosperm. Sledi priprava pivine, ki vključuje drozganje in vrenje sladice oziroma pivine, zatem poteče fermentacija, na koncu je na vrsti še maturacija (Wunderlich in Back, 2009).

#### 2.1.2.1 Drozganje in varjenje

Drozganje je proces, pri katerem v ustreznem razmerju zmešamo vročo vodo in zmleti slad. Namen tega koraka je aktivacija  $\alpha$ -amilaz in  $\beta$ -amilaz, ki lahko hidrolizirajo škrob na fermentabilne sladkorje, ti pa predstavljajo hrano kvasovkam. Škrob gre tekom drozganja skozi tri stopnje. Prva je gelatinizacija, druga je utekočinjenje, končna faza pa je saharifikacija. Temperatura drozge je zelo pomembna, saj imajo  $\alpha$ -amilaze in  $\beta$ -amilaze določen temperaturni optimum delovanja, in sicer med 60–70°C. Preden se drozgo segreje do temperaturnega območja, v katerem poteka saharifikacija, lahko izvedemo še tako imenovan proteinski počitek na temperaturi med 40–55°C. Pri tem koraku pride do proteolize. Za delovanje amilaz je pomemben tudi pH, ki mora biti v območju med 5,2–5,5 (Wunderlich in Back, 2009). Ko je drozganje končano in je hidroliziran ves škrob, ločimo sladico od ostanka sladu. Sladico vremo, med vrenjem vanjo dodajamo hmelj in tako dobimo pivino. Vrenje pivine navadno traja od 60–90 minut. Med tem pride do padca pH vrednosti, koagulacije proteinov, inaktivacije encimov, sterilizacije pivine, izomerizacije  $\alpha$ -kislin, izparevanja vode in tako koncentriranja sladkorjev ter izhlapevanja določenih snovi, na primer dimetil sulfida, ki pivu dajejo nezaželeno aromo in okus (Wunderlich in Back, 2009).

#### 2.1.2.2 Fermentacija in zorenje

Po vrenju pivine se ta ohladi, vanjo se vpihuje kisik, potem pa se jo prečrpa v fermentacijsko posodo. Ohlajeno pivino zatem čimprej inokuliramo z izbranim sevom kvasovk. Glaven način pridobivanja energije v anaerobni fazi je glikoliza, med katero iz ene molekule glukoze pride

do sprostitve dveh ATP molekul. Poleg glikolize tečejo še druge metabolne poti, ki v pivo prispevajo širok spekter senzorično pomembnih spojin. Na koncu fermentacije, ko so porabljeni vsi viri ogljika, začnejo kvasovke flokulirati, kar pomeni, da tvorijo med seboj skupke, ki se posedejo na dno fermentacijske posode, to pa vodi v zbistritev piva (Wunderlich in Back, 2009).

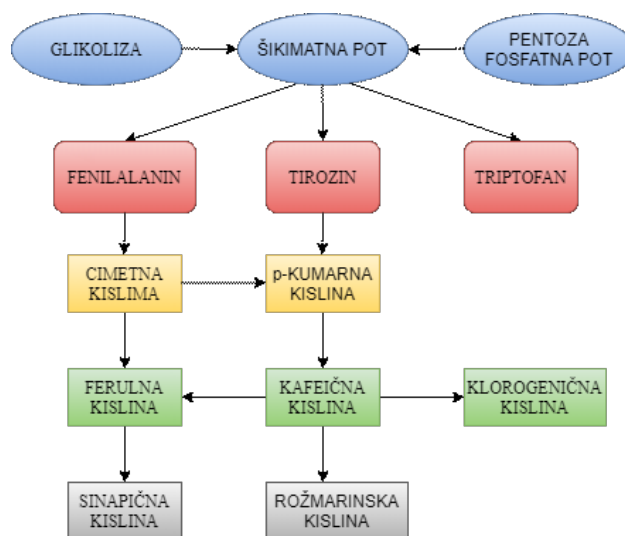
### **3 FENOLNE SPOJINE V PIVU**

V pivu lahko najdemo več skupin fenolnih spojin, in sicer enostavne fenolne spojine, sestavljene iz ene fenolne skupine, ter monomerne in oligomerne flavonoide. Fenolne spojine spadajo med najpomembnejše senzorično zaznavne molekule v pivu. V pivu predstavljajo potencialne anti in prooksidante, pivu neposredno dajejo pomembne organoleptične lastnosti, predstavljajo lahko prekurzorje spojin, ki dajejo aromo in okus, pomembne so tudi interakcije z drugimi spojinami. Vplivajo torej na okus, aromo, barvo in stabilnost piva. Reaktivni potencial fenolov je odvisen od njihove strukture, stopnje polimerizacije itd. Med procesi slajenja, varjenja in fermentacije so lahko fenolne spojine podvržene spremembam, ki vplivajo na njihovo sproščanje, koncentracijo in senzorično zaznavo v pivu (Wannenmacher in sod., 2018).

Monofenoli so najenostavnejši fenoli, sestavljeni iz enega fenolnega obroča z nizko molekularno maso in so senzorično najbolj pomembni fenoli. Sem spadajo fenolne kisline in hlapni monofenoli, ki so njihovi dekarboksilacijski produkti. Sem se uvršča tudi fenolni alkohol tirozol, ki nastane preko Ehrlichove metabolne poti iz tirozina (Drews in sod., 1965; Floridi in sod., 2003; Li in sod., 2008). Fenolne kisline lahko razdelimo med cimetne kisline in derivate benzoičnih kislin (Wannenmacher in sod., 2018).

Poleg monofenolnih spojin lahko v pivu najdemo še polifenole, le-te glede na kemijsko strukturo razdelimo na flavonoide, stilbene, kalkone, lignane in tanine (Callemien in Collin, 2009; Gerhäuser, 2005; Wannenmacher in sod., 2018).

### 3.1 HIDROKSICIMETNE KISLINE



Slika 1: Shematski prikaz sinteznih poti hidroksicimetnih kislin (Taofiq in sod., 2017)

Med hidroksicimetne kisline spadajo kafeična, ferulna, *p*-kumarna in sinapična kislina. Hidroksicimetne kisline lahko tvorijo derivate z aminokislinami in peptidi, kar vodi v nastanek amidov, najdene so tudi v esterski obliki (Slika 1) (Taofiq in sod., 2017). *p*-kumarna kislina je sintetizirana iz tirozina in fenilalanina oziroma iz cimetine kisline. Tirozin in fenilalanin nastaneta po šikimatni biosintezni poti. *p*-kumarna kislina predstavlja pomemben prekursor za sintezo kafeične, klorogenične, ferulne in sinapične kisline. Prekursor za sintezo cimetine kisline predstavlja fenilalanin. Kafeična kislina je ena izmed najpogostejših fenolnih kislin. Sinteza kafeične kisline poteka s hidroksilacijo *p*-kumarne kisline. Ferulno kislino lahko najdemo v pijačah, kot sta kava in pivo. Gre za derivat kafeične oziroma cimetine kisline in predstavlja prekursor za sintezo sinapične kisline. Slednja nastane s substitucijo metilne in hidroksilne skupine kafeične kisline, kar privede do nastanka ferulne kisline, ta pa se metilira v sinapično. Vsem hidroksilnim kislinam so skupne protimikrobne in antioksidativne lastnosti (Taofiq in sod., 2017).

## 4 METABOLIZEM HIDROKSICIMETNIH KISLIN

### 4.1 ORGANOLEPTIČNE LASTNOSTI HIDROKSICIMETNIH KISLIN IN NJIHOVIH DERIVATOV

V pivini od hidroskicimetnih kislin prevladujeta ferulna in *p*-kumarna kislina. Mikrobnimi encimi, ki ju lahko uporabijo kot substrat, omogočajo nastanek hlapnih fenolov. Tako so glavni hlapni fenoli, ki jih lahko najdemo v pivu, 4-vinilgvajakol in 4-etilgvajakol, ki nastaneta iz ferulne kisline, ter 4-vinilfenol in 4-etilfenol, ki nastaneta iz *p*-kumarne kisline (Lentz, 2018).

Hidroksicimetne kisline imajo v pivu visok prag organoleptične zaznave. Ta znaša 20–50 mg/L, v pivu pa je njihova koncentracija od 1 mg/L do 5 mg/L. Metabolni produkti hidroksicimetnih kislin se sicer organoleptično zaznajo že pri precej nižjih koncentracijah, in sicer med 0,1 mg/L ter 0,25 mg/L, odvisno od tega, za katero spojino gre, kar je prikazano v preglednici 1.

Preglednica 1: Minimalna koncentracija hlapnih fenolov v pivu za organoleptično zaznavo (Callemien in Collin, 2009)

Hlapni fenol	Prag organoleptične zaznave hlapnih fenolov v pivu (mg/L)
4-vinilgvajakol	0,25
4-etilgvajakol	0,13
4-vinilfenol	0,2
4-etilfenol	0,1

Organoleptična zaznava hlapnih fenolov se lahko precej razlikuje glede na to, kateri hlapni fenoli so prisotni, kakšna je njihova koncentracija, kakšna je koncentracija drugih aromatičnih spojin. Organoleptični deskriptorji glavnih hlapnih fenolov v pivu pa so prikazani v preglednici 2 (Crauwels in sod., 2015; Chatonnet in sod., 1992; Heresztyn in sod., 1986).

Preglednica 2: Organoleptični opis najpogostejših hlapnih fenolov v pivu in njihov izvor (Lentz, 2018)

Hlapni fenol	Organoleptična zaznava v pivu	Izvor
4-vinilgvajakol	klinčki, poper, curry, dim, slanina	dekarboksilacija ferulne kisline
4-vinilfenol	poper, fenolasto, razkužilo	dekarboksilacija kumarne kisline.
4-etilgvajakol	klinčki, poper, les, vanilija, dim	redukcija 4-vinilgvajakola
4-etilfenol	usnje, fenoli, poper, konjski znoj, dim	redukcija 4-vinilfenola
gvajakol	dimasto, slanina	ožgani leseni sodi
vanilin	vanilija, sladko	staranje v lesu, razpad 4-vinil gvajakola
4-vinil siringol (kanolol)	staro, pokvarjeno pivo	razpad glikozidov sinapične kisline

## 4.2 IZVOR HIDROKSICIMETNIH KISLIN V PIVU

Enostavni in hlapni fenoli v pivu primarno izvirajo iz rastlinskega materiala (slad in hmelj). Obstajajo tudi manj direktni izvori kot na primer ekstrakcija fenolov iz lesa med zorenjem piva v lesenih sodih ali pa iz dima, ki se uporablja za dimljenje sladu pri proizvodnji dimljenih piv (Lentz, 2018).

#### 4.2.1 Hidroksicimetne kisline v sladu

Hidroksicimetne kisline so integrirane v celične stene sladnih zrn. Prevladujeta ferulna in *p*-kumarna kislina, sinapična kislina pa je prisotna v nekoliko nižjih koncentracijah, njihova struktura je prikazana na sliki 2 (Callemien in sod., 2009).

Znotraj celične stene imajo hidroksicimetne kisline pomembno vlogo pri formaciji kompleksnega polimera lignina, ki celicam daje trdnost. Hidroksicimetne kisline predstavljajo tudi vez med ligninskimi in drugimi vlakni kot na primer hemicelulozo, prav tako branijo celice pred patogenimi organizmi, saj njihova prisotnost zmanjša biorazgradljivost celične stene, v prosti obliki pa so za mikroorganizme toksične (Vanholme in sod., 2010; Iiyama in sod., 1994; Faulds in Williamson, 1999).

Koncentracija hidroksicimetnih kislin v sladu lahko varira in je odvisna od poteka slajenja, okolja, v katerem ječmen raste, in od ravnanja z ječmenom po žetvi. Izmerjene koncentracije se prav tako močno razlikujejo. Razpon sega od 10–15 µg na g sladu za obe kislini skupaj, do 100–300 µg/g *p*-kumarne kisline in 400–600 µg/g ferulne kisline (Lentz, 2018).



Slika 2: Struktura hidroksicimetnih kislin (Lentz, 2018)

Hidroksicimetne kisline so v sladu lahko v esterificirani ali prosti obliki. Več kot 90% hidroksicimetnih kislin v sladu je v esterificirani obliki, tako je njihova dostopnost za ekstrakcijo močno odvisna od encimov v slajenih ječmenovih zrnih, ki razgrajujejo arabinoksilane med drozganjem (arabinofuranozidaza in β-ksilan-endohidrolaza) (Vanbeneden in sod., 2007, 2008; Hernanz in sod., 2001; McMurrough, 1996).

#### 4.2.2 Hidroksicimetne kisline v hmelju

Vsebnost hidroksicimetnih kislin v hmelju je nekoliko slabše raziskana. Nahajajo se predvsem v celičnih stenah znotraj rastlinskega materiala hmeljnega storžka in ne v njegovi sredici. Na gram teže lahko hmelj vsebuje tudi 5-krat več skupnih hidroksicimetnih kislin kot slad, vendar pa je količina hmelja, ki se uporablja pri varjenju, mnogo nižja od količine slada (McMurrough in sod., 1984). Oblika, v kateri se uporablja hmelj med varjenjem, in njegova količina vplivata na količino hidroksicimetnih kislin, ki jih hmelj prispeva v pivino.



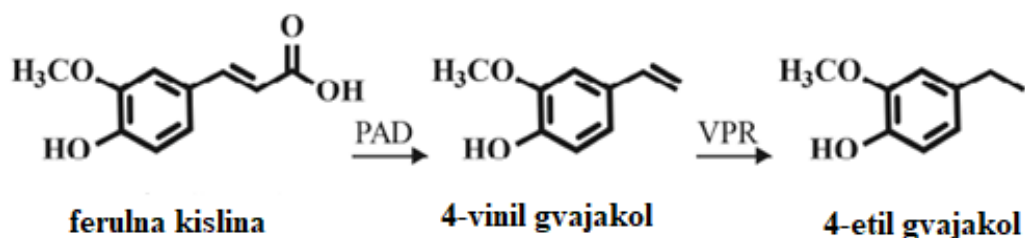
### 4.3 TRANSFORMACIJA HIDROKSICIMETNIH KISLIN V PIVINI IN PIVU

Hidroksicimetne kisline se lahko transformirajo v vinilno ali etilno obliko preko različnih mehanizmov, lahko pride do termične transformacije med procesom slajenja in vrenja pивine, lahko pa je pretvorba encimatska (McMurrough in sod., 1996; Meilgaard, 1975).

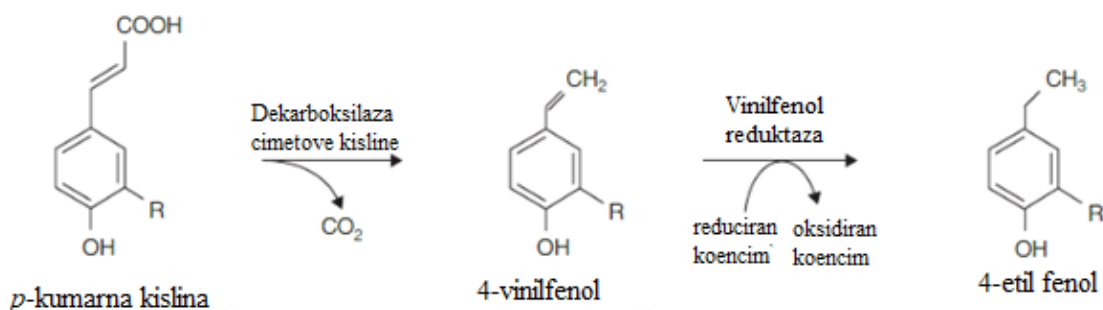
#### 4.3.1 Termična dekarboksilacija

Termična dekarboksilacija hidroksicimetnih kislin začne potekati šele pri temperaturi med 90°C in 100°C. Proces je pri teh temperaturah zelo počasen in tako v pivino prispeva zanemarljivo količino 4-vinilgvajakola (Lentz, 2018; Callemien in Collin, 2009; Coghe in sod., 2004).

#### 4.3.2 Encimatska dekarboksilacija hidroksicimetnih kislin v vinilne derivate



Slika 3: Metabolizem ferulne kisline (Lentz, 2018)



Slika 4: Metabolizem p-kumarne kisline (Steensels in sod., 2015)

Mnogo bakterij in gliv, ki živijo v okoljih bogatih z rastlinskim materialom, je sposobnih encimatske pretvorbe ferulne kisline, saj jim omogoča obrambo pred protimikrobnimi lastnostmi hidroksicimetnih kislin (Lentz, 2018).

Za dekarboksilacijo fenolnih kislin imajo organizmi gene za ustrezne dekarboksilaze (*PAD* – gen za dekarboksilazo fenolnih kislin) oziroma morajo biti genotipsko *PAD*<sup>+</sup>. Dekarboksilacija omogoča transformacijo hidroksicimetnih kislin v njihove vinilne derivate (Slika 3 in 4) (Lentz, 2018; Shinohara in sod., 2000).

Sevi *Saccharomyces cerevisiae*, ki imajo fenotip POF+, lahko aktivno dekarboksilirajo derivate cimetovih kislin. 4-vinilgvajakol in 4-vinilfenol nastaneta preko encimatske dekarboksilacije ferulne in *p*-kumarne kisline (Slika 3 in 4) (Vanbeneden in sod., 2008). Za nastanek značilnega organoleptičnega karakterja v pivu sta odgovorna dva encima, in sicer dekarboksilaza cimetove kisline (Pad1) in dekarboksilaza ferulne kisline (Fdc1). Encim Pad1 je kodiran z genom *YDR539W* in omogoča delovanje *FDC1* (Lentz, 2018; Mukai in sod., 2010, 2014).

Fdc1 je protein, ki ga kodira gen *YDR539* in je sestavljen iz 503 aminokislin, ki katalizira dekarboksilacijo cimetne, *p*-kumarne in ferulne kisline. Med mnogimi, dobro okarakteriziranimi dekarboksilazami je Fdc1 *Saccharomyces cerevisiae* edina, ki lahko poleg hidroksicimetnih kislin kot substrat uporabi tudi cimetovo kislino.

Različni komercialno dostopni sevi *Saccharomyces cerevisiae* imajo različne aktivnosti Pad1, mnogo sevov pa je z evolucijo oziroma selekcijo zaradi mutacij v genih *PAD1* in *FDC1* izgubilo zmožnost metabolizma cimetove, *p*-kumarne in ferulne kisline in so tako postali POF negativni (fenotip POF-) (Mukai in sod., 2010).

#### 4.3.2.1 Vinilfenol reduktaza kvasovk rodu *Brettanomyces*

*Saccharomyces cerevisiae* ne more naprej reducirati vinilnih derivatov hidroksicimetnih kislin, saj nima ustreznih encimov. *Brettanomyces* kvasovke lahko še naprej katabolizirajo 4-vinilgvajakol ter 4-vinilfenol, ki nastaneta z metabolno aktivnostjo *Saccharomyces cerevisiae*. Nadaljnji katabolizem v etilfenole lahko izvedejo z encimom, imenovanim vinilfenol reduktaza (Vpr), ki 4-vinilgvajakol reducira v 4-etilgvajakol in 4-vinilfenol v 4-etilfenol (Slika 3 in 4) (Steensels in sod., 2015).

## 5 EVOLUCIJA IN UDOMAČITEV PIVOVARSKIH KVASOVK

Louis Pasteur je ugotovil, kakšna je vloga kvasovk pri fermentacijah, Christian Hansen pa je uvedel uporabo čistih kultur v proces pivovarstva in tako povečal konsistenco in kvaliteto varjenih piv (Iattici in sod., 2019). Pivovarji, vinarji in peki so že pred Pasteurjevimi in Hansenovimi odkritji uporabljali kulture kvasovk. Spoznali so, da inokulacija nefermentiranega živila s fermentiranim privede do hitre in predvidljive fermentacije. Tako so nastale linije sevov kvasovk, ki so preko mnogo generacij uspevale v človeško ustvarjenih okoljih, izgubile pa so stik z naravnimi nišami in divjimi sevi. Fermentacija določenih sevov je bila hitrejša, bolj konstantna, živila so imela boljšo aromo in okus, zato so bili ti sevi večkrat uporabljeni in so bolj ugajali človeškemu merilu. Tako je njihovo evolucijo v veliki meri narekoval človek, takšno početje pa je privedlo do nastanka modernih sevov *Saccharomyces cerevisiae*, ki se uporabljajo v industrijski proizvodnji piva, kruha, vina itd. (Goddard in Greig, 2015; Warringer in sod., 2011).

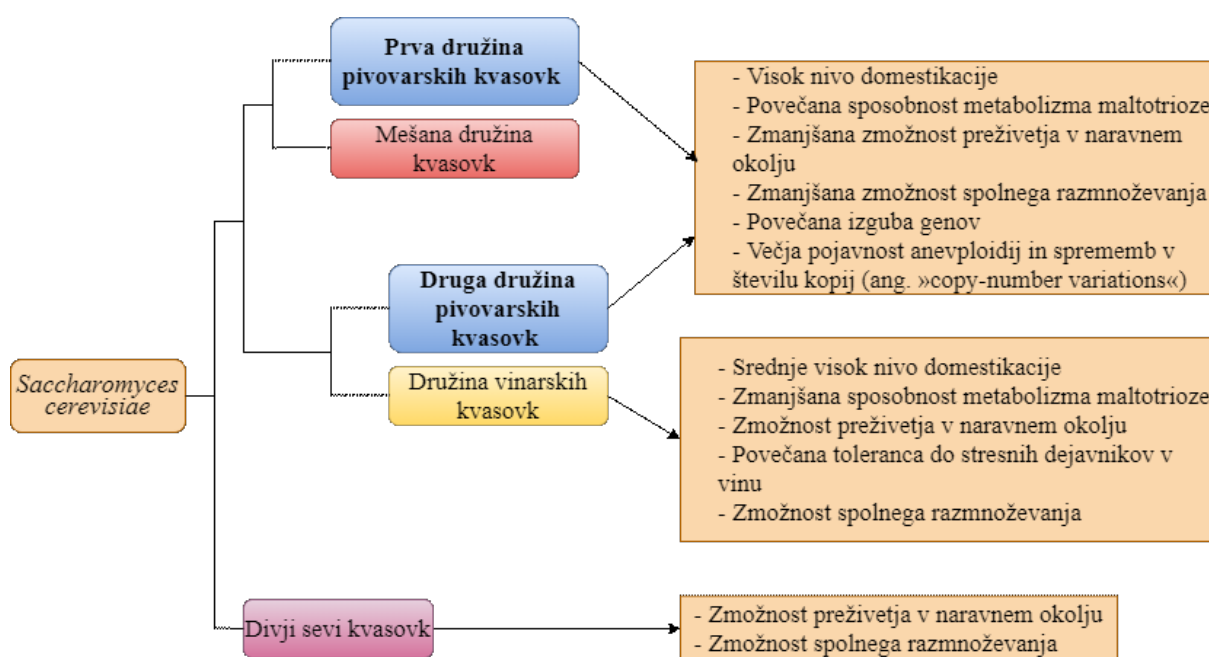
## 5.1 DEFINICIJA UDOMAČITVE

Domestikacija oziroma udomačitev je proces, s katerim človek preko umetne selekcije in vzreje divjih vrst pride do novih, udomačenih vrst, ki uspevajo v okoljih, ustvarjenih s strani človeka, v naravnih okoljih pa ne uspevajo dobro. Ključna značilnost udomačitve je prilagoditev fenotipa na človeško ustvarjene okolijske niše in poudarjanje lastnosti, ki jih od organizma želi in pričakuje človek. Značilni znaki, ki nakazujejo, da je določena vrsta šla skozi proces udomačevanja, so fenotipske spremembe in spremembe v genomski strukturi (Driscoll in sod., 2009; Purugganan in Fuller, 2009; Gallone in sod., 2016).

## 5.2 GEOGRAFSKI IZVORI UDOMAČENIH SEVOV *Saccharomyces cerevisiae*

Študije velikega števila različnih sevov *Saccharomyces cerevisiae* in uporaba tehnik, kot so sekvenciranje genomov, *de novo* zlaganje genoma, anotacija genov in fenotipizacija, so pripeljale do spoznanja, da se sevi *Saccharomyces cerevisiae*, ki se uporabljajo v industrijski proizvodnji piva, vina, kruha, sakeja in bioetanola, genotipsko in fenotipsko razlikujejo od divjih sevov (Gallone in sod., 2016). Industrijski sevi izvirajo iz zgolj omejenega števila izvornih linij sevov. Ti so se skozi zgodovino dodatno razvejali v pet družin. Vse družine izvirajo iz prednika *Saccharomyces cerevisiae*. Tako je prišlo do nastanka vinarske, prve in druge družine pivovarskih kvasovk ter mešane družine (Slika 5). Prva družina pivovarskih kvasovk je sestavljena iz treh geografsko ločenih podskupin, njihov skupni prednik pa sega v leta med 1573 in 1604, kar nakazuje tudi na začetke domestikacije v teh letih (Gallone in sod., 2016). Ena podskupina izvira iz kontinentalne Evrope, natančneje iz Nemčije in Belgije, druga izvira iz območja Velike Britanije, tretja pa iz območja Združenih držav Amerike. Slednja je najmlajša, saj se je razvila iz druge skupine (Gallone in sod., 2016). Filogenetske analize kažejo na to, da se je vsaka od treh podskupin po začetni ločitvi razvijala posebej, saj ni med njimi znakov mešanja genov (Gallone in sod., 2016).

Udomačitev druge družine pivovarskih sevov se je začela nekoliko kasneje in je v primerjavi s prvo bolj sorodna vinarskim kvasovkam (Slika 5). Zadnji skupni prednik sevov iz te skupine sega med leta 1645 in 1671. Vsebuje seve, ki izhajajo iz Belgije, Velike Britanije, Združenih držav Amerike, Nemčije in Vzhodne Evrope. Obstoje dveh ločenih družin pivovarskih sevov nakazuje na dve ločeni poti domestikacije izvornih sevov v Evropi (Gallone in sod., 2016).



Slika 5: Prikaz filogenije in evolucijskih sprememb udomačenih družin kvasovk (Gallone in sod., 2016)

### 5.3 UDOMAČITEV *Saccharomyces cerevisiae*

Zaradi spremembe iz spremenljivega, kompleksnega in pogosto neugodnega okolja v stabilen, s hranili bogat medij piva je prišlo do posebnih adaptacij pivovarskih kvasovk. Določene lastnosti so pridobile, določene pa izgubile. Prišlo je na primer do izgube funkcionalnega spolnega reprodukcijskega cikla. Človeška selekcija se pri pivovarskih sevih kaže izrazito z evolucijo v smeri zmožnosti učinkovitega metabolizma virov ogljika, ki jih najdemo v pivu in v izgubi funkcionalnosti določenih genov, ki omogočajo biosintezo spojin, ki dajejo pivu nezaželen priokus in arome. Namreč *MAL* geni, ki omogočajo metabolizem maltoze, so pri pivovarskih sevih mnogokrat podvojeni, saj omogočajo učinkovit metabolizem maltoze, ki se nahaja v pivini. Določeni sevi so na primer izgubili zmožnost proizvodnje 4-vinilgvajakola preko mutacij *PADI* in *FDC1* genov, ki omogočajo metabolizem hidroksicimetnih kislin, saj se 4-vinilgvajakol v večini stilov piva šteje kot nezaželen priokus.

Variacije v genomski strukturi kot so na primer poliploidije, aneuploidije, podvojitve velikih genskih segmentov in spremembe v številu kopij genov (ang. »copy-number variations«) se pogosto pojavljajo pri udomačitvi in adaptaciji na specifične niše eksperimentalno razvitih genetskih variant. (Bergström in sod., 2014; Borneman in sod., 2011; Dunham in sod., 2002; Dunn in sod., 2012; Pavelka in sod., 2010; Rancati in sod., 2008; Selmecki in sod., 2009; Voordeckers in sod., 2015; Purugganan in Fuller, 2009).

Preko določitve števila kromosomov kvasovk in analize velikih kromosomskih reorganizacij ter aneuploidij je bilo odkritih mnogo pomnožitev in delecij genskih segmentov, od katerih je slednjih več. Velikost teh spremenjenih regij je različna. Spremembe so lahko na nivoju

celotnih kromosomov, kar vodi v nastanek aneuploidij, lahko pa so spremenjeni zgolj majhni segmenti v velikosti nekaj kilobaz (Gallone in sod., 2016).

Frekvenca pojavnosti delecij in sprememb v številu kopij se precej razlikuje med sevi, ki se uporabljajo v različnih industrijskih aplikacijah. Pri pivovarskih sevih je opaziti večjo frekvenco teh, kar se povezuje tudi z večjo pojavnostjo poliploidij in aneuploidij, to pa vodi v izgubo kromosomov in večjo genomsko nestabilnost (Sheltzer in sod., 2011). Pivovarske kvasovke so namreč šle skozi intenzivnejšo selekcijo, saj se kvasna biomasa med šaržami piva velikokrat večkrat ponovno uporabi in se pred vsako uporabo prouči, če je še ustrezna za fermentacijo (Gallone in sod., 2016).

Frekvenca pojavnosti sprememb v številu kopij ni enakomerno razporejena po celotnem genomu, temveč je večja v območjih, kjer se nahajajo geni pod večjim selekcijskim pritiskom. To so na primer geni, vključeni v metabolizem dušika in ogljika, transport ionov in flokulacijo (Bergström in sod., 2014; Dunn in sod., 2012). Spremembe v številu kopij se navezujejo tudi na okoljske niše, v katerih kvasovke živijo. Tako so na primer pri pivovarskih kvasovkah močno pomnoženi geni, ki omogočajo vnos in metabolizem maltoze, ki se nahaja v pivini, na drugi strani pa so pogosto izgubljeni pri vinarskih kvasovkah, saj grozdni sok ne vsebuje maltoze. Na drugi strani pa so vinarske kvasovke sposobne zdržati večje osmotske pritiske, saj je v grozdnem soku več sladkorja kot v pivini, bolje tudi tolerirajo višje koncentracije etanola, saj je koncentracija tega v vinu višja (Gallone in sod., 2016).

Določene lastnosti so se med evolucijo pivovarskih kvasovk tudi izgubile. Prišlo je do izgube funkcionalnega spolnega reprodukcijskega cikla, saj je nespolni način razmnoževanja v, s hranili bogatem in stabilnem mediju, ki ga predstavlja pivina oziroma pivo, uspešnejši. Rezultat dolgih obdobj nespolnega razmnoževanja, ponovne uporabe kvasne biomase med šaržami piva, hitre produkcije in selekcije mnogih generacij kvasovk je tudi večja mera homozigotnosti med pivovarskimi sevi. Zaradi tega imajo manjšo sposobnost preživetja in uspevanja v naravnih okoljih (Gallone in sod., 2016).

#### 5.4 SELEKCIJA INDUSTRIJSKIH SEVOV *Saccharomyces cerevisiae*

Industrijsko pomembne lastnosti *Saccharomyces cerevisiae* vključujejo produkcijo različnih arom, etanola, zmožnost izrabe različnih virov ogljika, ponovljivost in hitrost fermentacije, toleranco na višje koncentracije etanola, zmožnost flokulacije in temperaturni optimum fermentacije.

### 5.4.1 Metabolizem maltotrioze

Sposobnost metabolizma maltotrioze, ki je prisotna v pivini, korelira z aktivnostjo in prisotnostjo *AGT1* alela, ki kodira transportni protein Mal11. Ta ima visoko afiniteto do maltotrioze ter tako omogoča njen transport v celico. Dotični alel je prisoten samo v prvi družini pivovarskih sevov. Pri vinarskih sevih manjka celoten *MALI* lokus. Kvasovke iz druge družine pivovarskih sevov načeloma lahko metabolizirajo maltotriozo, vendar imajo na tem lokusu številne insercije in delecije, kar privede do sprememb bralnega okvirja. Na celotnem *MALI* lokusu je tudi manjša frekvenca sprememb v številu kopij. Vse to kaže, da morajo imeti ti sevi druge mehanizme za transport maltotrioze v celico in da se je ta transport ločeno razvijal pri obeh linijah (Gallone in sod., 2016).

### 5.4.2 Evolucija genov *PAD1* in *FDC1* in metabolizma hidroksicimetnih kislin

Industrijske kvasovke v idealnih pogojih ne bi smele proizvajati nezaželenih arom in okusov. 4-vinilgvajakol, ki daje pijačam pikantno, klinčkasto organoleptiko se v določenih stilih piva (bavarsko, belgijsko pšenično pivo itd.) tolerira, v večini stilov pa gre za nezaželeno aromo oziroma okus. Za pojav značilne organoleptike sta odgovorna dva encima, in sicer dekarboksilaza cimetove kisline (*Pad1*) in dekarboksilaza ferulne kisline (*Fdc1*). Sevi *Saccharomyces cerevisiae*, ki lahko aktivno producirajo 4-vinil gvajakol, imajo tako imenovani fenotip POF+ (ang. »phenolic off flavor«) (Lentz, 2018; Mukai in sod., 2014; Gallone in sod., 2016).

Spremembe med fenotipom POF+ in POF- so se dogajale že v samem začetku evolucije *Saccharomyces cerevisiae*. Večina sevov iz prve skupine pivovarskih kvasovk je preko mutacij izgubila POF+ fenotip. Obstajajo trije sevi kvasovk, s katerimi se proizvaja pivo stila »hefeweizen«. V bavarskem pšeničnem pivu je na primer povišana koncentracija 4-vinil gvajakola zaželeno. Gre za seve BE072, BE074 in BE093, ki izvirajo iz prve družine pivovarskih sevov in so POF+. Ti sevi vsebujejo gene iz vseh treh podskupin družine (večinoma iz Nemčije in Belgije), kar nakazuje na hibridizacijo med različnimi udomačenimi podskupinami (Gallone in sod., 2016).

Fiziološka vloga *Pad* in *Vpr* encimov ni popolnoma razumljena. Geni za dekarboksilaze omogočajo kvasovkam detoksifikacijo hidroksicimetnih kislin, *Vpr* pri redukciji vinilnih derivatov hidroksicimetnih kislin uporablja NADH, kar lahko vpliva na ohranjanje redoks potenciala celice (Curtin in sod., 2013; Larsson in sod., 2001).

Pokazano je bilo tudi, da etilni fenoli, ki so produkt *Vpr*, privlačijo žuželke. Vinska mušica ne more direktno zaznavati hidroksicimetnih kislin, lahko pa zazna etilfenole, ki so produkt encimatske aktivnosti *Brettanomyces* kvasovk. To lahko predstavlja veliko prednost pri raznosu celic kvasovk v okolje (Dweck in sod., 2015).

## 5.5 IZBOLJŠAVE SEVOV PIVOVARSKIH KVASOVK

V pivovarstvu so tehnike vzgoje in slajenja ječmena tehnološko napredne, slad je v primerjavi s preteklostjo boljši oziroma kvalitetnejši, enako velja tudi za hmelj. V zadnjem času se zato veliko pozornosti namenja izboljšavam sevov kvasovk.

S študijami evolucije pivovarskih kvasovk je prišlo do spoznanja, da so moderni sevi rezultat stoletij umetne selekcije in domestikacije. V času, v katerem so tehnologije sekvenciranja relativno poceni in se znanja ter podatki genomike, transkriptomike povečujejo, prihaja do odkrivanja novih polimorfizmov, ki prispevajo k boljšim industrijskim lastnostim. Tako je omogočena hitrejša selekcija, ki temelji na genetskih markerjih, hitreje lahko odkrivamo nove seve, ustvarjamo hibride in sheme križanj. Križanje sevov kvasovk z uporabo genetskih markerjev se danes veliko uporablja in razvija, nastajajo sevi, ki omogočajo nastanek novih organoleptičnih lastnosti piva (Gallone in sod., 2016).

### 5.5.1 Strategije razvoja pivovarskih kvasovk

Izboljšave sevov lahko potekajo na več načinov, na primer s pomočjo hibridizacije, kamor spada tudi fuzija protoplastov. Izvaja se še mutageneza, ki poteka z uporabo mutagenov, kot sta etil metasulfonat (EMS) in UV svetloba. Druga tehnika je hibridizacija kvasovk. Nove seve kvasovk lahko izoliramo tudi iz okolja. Uporabljajo se še citodukcija, usmerjena evolucija in gensko inženirstvo (Steensels in sod., 2014).

#### 5.5.1.1 Hibridizacija

S hibridizacijo želimo kombinirati pozitivne lastnosti starševskih sevov v en hibriden sev. Največkrat se uporablja parjenje spor, zlitje protoplastov ali pa naključno parjenje. Pri parjenju spor pride do konjugiranja haploidnih spor in nastanka diploidnih hibridov, ki imajo določene lastnosti starševskih spor. Starševske spore pa izberemo na podlagi ustreznih industrijskih lastnosti. Na koncu moramo hibridne spore ustrezno selekcionirati in tako izbrati tiste, ki imajo ugodne fenotipe. Tak način hibridizacije se lahko uporablja zgolj med zelo sorodnimi sevi (Steensels in sod., 2014).

Fuzija protoplastov je tehnika, ki vključuje tri korake. Najprej odstranimo celično steno, največkrat s pomočjo encimov, potem induciramo hibridizacijo, na koncu pa je potrebna regeneracija celične stene. Nato izvedemo še selekcijo in izberemo hibridne spore z ugodnimi fenotipi. Slabost vseh hibridizacij je, da je uspeh zelo nizek, nastanejo mitotično nestabilni organizmi, pojavi se izguba in neenakomerna razdelitev kromosomov. Največji problem hibridizacije je, da morajo starševske kvasovke sporulirati, pivovarske kvasovke pa so v večini izgubile zmožnost funkcionalnega spolnega cikla in tako zmožnost sporulacije (Jenko, 2013; Kavanagh in Whittaker, 1996; Steensels in sod., 2014; Vrhovnik, 2019).

### 5.5.1.2 Mutageneza

Pri mutagenezi s pomočjo mutagenih dejavnikov, kot so etil metasulfonat (EMS) in UV svetloba, induciramo naključne mutacije v genomu kvasovk. Pri tej tehniki kvasovke za določen čas izpostavimo mutagenemu dejavniku, pri čemer določimo čas izpostavitve in mutageni dejavnik, ki bo uporabljen. Po izpostavitvi kvasovkam pustimo čas, da si opomorejo, nato pa pregledamo, ali je prišlo do ugodnih mutacij in tako nastanka izboljšanega seva. Problem te tehnike je, da je ustrezen čas izpostavitve mutagenemu dejavniku težko določiti in največkrat pride do neugodnih mutacij, kar dela to tehniko precej neučinkovito (Steensels in sod., 2014).

### 5.5.1.3 Citodukcija

Nekatere lastnosti, ki so ugodne za industrijske fermentacije, niso zakodirane v jedru kvasovk, ampak v mitohondrijski DNA in citoplazmi. Tam so zakodirane mnoge respiratorne poti, zato je smiselno, da se te lastnosti prenese v nove seve, tako pa se ohrani celovitost jedra. Pri procesu citodukcije ima donorski sev, ki citoplazemsko prenosljiv faktor, okvarjen gen *KARI*, kar mu onemogoča jedrno fuzijo (Conde in Fink, 1976) Po fuziji protoplastov donorske in sprejemne celice nastane tako imenovani heterokarion, ki lahko preko mitotskih delitev in brstenja producira haploidne celice. Med tem pride do heteroplazmije, kar pomeni, da nastane hibrid, ki je haploiden, vsebuje pa mešane citoplazemske faktorje. Tako lahko dobimo kvasovke z želenim fenotipom, ki je posledica prenosa citoplazemskih faktorjev in ne zlitja jeder (Steensels in sod., 2014).

### 5.5.1.4 Usmerjena evolucija

To je tehnika, s katero usmerjamo evolucijo organizmov na tak način, da na koncu pridemo do nekkih zelenih fenotipov. Izvaja se tako, da v gojišču gojimo populacijo celic in na njej konstantno ter skozi več generacij izvajamo selekcijo zelenih fenotipov. Skozi čas pride do naključnih mutacij v populaciji. Selekcijo izvajamo na tak način, da celice gojimo pod selektivnimi pogoji, kar privede do pojava več variant organizmov, za nadaljnje gojenje in selekcijo pa izberemo tiste, ki kažejo zelen fenotip. Če usmerjeno selekcijo kombiniramo s tehnikami mutageneze in hibridizacije, povečamo genetsko in fenotipsko raznolikost, na kateri lahko izvajamo selekcijo. Ko pride do pojava mutacije, ki poveča fitnes določenih celic, izberemo te celice in na njih naprej izvajamo selekcijske pritiske. Celice lahko gojimo v seriji več šaržnih bioprosesov, lahko pa jih gojimo s kontinuirnim bioprosesom v turbistatu ali kemostatu. Usmerjena evolucija je uporabno orodje za ustvarjanje sevov s specifičnimi izboljšanimi karakteristikami (Steensels in sod., 2014).



### 5.5.1.5 Gensko inženirstvo

Gensko inženirstvo je najnovejša ter najnatančnejša tehnika izboljšav industrijskih sevov in je bila na *Saccharomyces cerevisiae* že uspešno uporabljena za izboljšanje produktivnosti, povečanja spektra metabolizma različnih substratov, zmanjšanje produkcije nezaželenih stranskih produktov, povečanje produkcije zaželenih stranskih produktov itd. (Borgne, 2012). Z genskim inženirstvom lahko amplificiramo gene in tako povečamo sintezo produkta, ki ga kodirajo. To lahko dosežemo z vstavljanjem želenega gena v plazmidni vektor v večjem številu kopij. Večina plazmidov je sicer nestabilnih pod neselektivnimi pogoji in se hitro izgubijo. Kromosomska integracija je stabilnejši način integracije, s katerim se lahko izognemo nestabilnosti plazmidnih vektorjev. S pomočjo regij ribosomalne DNA, ki so lahko tarča za kromosomsko integracijo pri industrijskih sevih, se lahko doseže učinkovita in stabilna integracija. Prednost genskega inženirstva je tarčno vnašanje genov in tako učinkovitejše pridobivanje novih sevov. Največji problem pa predstavlja dejstvo, da pri uporabi teh tehnik nastanejo gensko spremenjeni organizmi, ki se po zakonodaji znotraj Evrope ne smejo uporabljati v živilski industriji (Borgne, 2012).

## 6 ZAKLJUČEK

Industrijske kvasovke v idealnih pogojih ne bi smele proizvajati nezaželenih arom in okusov. Med fenolnimi spojinami v pivu so z organoleptičnega vidika najpomembnejši prekursorji hidroksicimetnih kislin. Te izvirajo večinoma iz sladju in hmelja. Nahajajo se znotraj rastlinskih celičnih sten, kjer imajo vlogo tvorbe, povezovanja in utrjevanja vlaken ter protimikrobno vlogo. Od genetike posameznega seva kvasovk je odvisno, ali v pivu pride do pojave nezaželenega fenolnega okusa (ang. »phenolic off flavour«). Kvasovke, ki imajo fenotip POF+, lahko preko biotransformacije dekarboksilirajo ferulno in *p*-kumarno kislino, kar vodi v nastanek 4-vinilgvajakola in 4-vinilfenola. POF+ kvasovke imajo funkcionalno dekarboksilazo cimeto ve kisline (Pad1) in dekarboksilazo ferulne kisline (Fdc1), ki omogočata potek metabolnih poti za nastanek 4-vinilgvajakola in 4-vinilfenola. *Brettanomyces* kvasovke imajo sposobnost nadaljnje dekarboksilacije vinilnih derivatov hidroksicimetnih kislin, vsebujejo namreč gene za encim vinilfenol reduktaza (*VPRI*), ki 4-vinilgvajakol reducira v 4-etilgvajakol in 4-vinilfenol v 4-etilfenol. Pad in Vpr encimi kvasovkam omogočajo detoskifikacijo hidroksicimetnih kislin, produkti metabolizma Vpr pa privlačijo žuželke, kar lahko predstavlja veliko prednost pri raznosu celic kvasovk v okolje.

Industrijski sevi kvasovk, ki se uporabljajo v pivovarski industriji, so produkt več stoletne umetne selekcije. Pri pivovarskih sevih se človeška selekcija kaže izrazito z evolucijo v smeri zmožnosti učinkovitega metabolizma virov ogljika, ki jih najdemo v pivu, in v izgubi funkcionalnosti določenih genov, ki omogočajo nastanek in biosintezo spojin, ki dajejo pivu nezaželene priokuse in arome. Vinilni derivati hidroksicimetnih kislin se v določenih stilih piva (bavarsko, belgijsko pšenično pivo itd.) tolerirajo oziroma je njihova prisotnost zaželena,

v večini stilov pa gre za nezaželeno aromo oziroma okus. Tako je skozi selekcijo večina sevov izgubila fenotip POF+. Tega lahko najdemo še pri BE072, BE074 in BE093 sevih iz prve družine pivovarskih kvasovk (Slika 5). Do nastanka teh sevov je prišlo s hibridizacijo med različnimi udomačenimi podskupinami kvasovk.

Nove seve kvasovk lahko odkrivamo v okolju in jih iz njega izoliramo. Tako lahko najdemo seve z novimi, industrijsko zanimivimi lastnostmi. Z razumevanjem evolucije in genetike kvasovk pa lahko seve tudi izboljšujemo, kar lahko poteka na več načinov (hibridizacija, mutageneza, citodukcija, usmerjena evolucija, gensko inženirstvo itd.). Na tak način pridemo do novih sevov z unikatnimi lastnostmi, ki omogočajo nastanek novih, zanimivih organoleptičnih lastnosti v pivu. Tako razvoj novih sevov predstavlja možnost razvoja novih stilov piva in nov trend v pivovarski industriji.

## 7 VIRI

- Bergström A., Simpson J.T., Salinas F., Barré B., Parts L., Zia A., Nguyen Ba AN., Moses A.M., Louis E.J., Mustonen V., Warringer J., Durbin R., Liti G. 2014. A high-definition view of functional genetic variation from natural yeast genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 31, 4: 872–888
- Borgne S. 2012. Genetic engineering of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology*, 824: 451–465
- Borneman A.R., Desany B.A., Riches D., Affourtit J.P., Forgan A.H., Pretorius I.S., Egholm M., Chambers, P.J. 2011. Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genetics*, 7, 2: e1001287, doi:10.1371/journal.pgen.100128735–43: 11 str.
- Callemien D., Collin S. 2009. Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer. *Food Reviews International*, 26, 1: 1–84
- Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N., Pons M. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60, 2: 165–178
- Coghe S., Benoot K., Delvaux F., Vanderhaegen B., Delvaux F.R. 2004. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3: 602–608
- Conde, J., in Fink, G. R. 1976. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, 10, 3651–3655
- Crauwels S., Steensels J., Aerts G., Willems K., Verstrepe, K., Lievens B. 2015. *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. *Brewing Science*, 68, 11: 110–121
- Curtin C.D., Langhans G., Henschke P.A., Grbin P.R. 2013. Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 2: 241–247

- Drews B., Specht H., Schwartz E. 1965. Die aromatischen alkohole im bier. *Monatsschrift für Brauerei*, 18: 240–242
- Driscoll C.A., Macdonald D.W., O'Brien S.J. 2009. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 1: 9971–9978
- Dunham M.J., Badrane H., Ferea T., Adams J., Brown P.O., Rosenzweig F., Botstein D. 2002. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 25: 16144–16149
- Dunn B., Richter C., Kvitek D.J., Pugh T., Sherlock G. 2012. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments. *Genome Research*, 22, 5: 908–924
- Dweck H.K., Ebrahim S.A., Farhan A., Hansson B.S., Stensmyr M.C. 2015. Olfactory proxy detection of dietary antioxidants in *Drosophila*. *Current Biology*, 25, 4: 455–466
- Faulds C.B., Williamson G. 1999. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 3: 393–395
- Floridi S., Montanari L., Marconi O., Fantozzi P. 2003. Determination of free phenolic acids in wort and beer by coulometric array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6: 1548–1554
- Gallone B., Steensels J., Prahl T., Soriaga L., Saels V., Malaver B., Merlevede A., Roncoroni M., Voordeckers K., Miraglia L., Teiling C., Steffy B., Taylor M., Schwartz A., Richardson T., White T., White C., Baele G., Maere S., Verstrepen K. 2016. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, 166, 6: 1397–1410
- Gerhäuser C. 2005. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European journal of cancer*, 41, 13: 1941–1954
- Goddard M.R., Greig D. 2015. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?, *FEMS Yeast Research*, 15, 3: fov009, doi:10.1093/femsyr/fov009: 6 str.
- Heresztyn T. 1986. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Archives of Microbiology*, 146, 1: 96–98
- Hernanz D., Nuñez V., Sancho A.I., Faulds C.B., Williamson G., Bartolomé B., Gómez Cordovés C. 2001. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 10: 4884–4888
- Iattici F., Catallo M., Solieri L. 2020. Designing New Yeasts for Craft Brewing: When Natural Biodiversity Meets Biotechnology. *Beverages*, 6, 3: doi: 10.3390/beverages6010003: 20 str.
- Iiyama K., Lam T.B.T., Stone B.A. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology*, 104, 2: 315–320
- Jenko M. 2013. Vpliv kvasovk na vsebnosti glutationa in aromatičnih spojin v vinih sauvignon: doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 166 str.

- Kavanagh K., Whittaker P. 1996. Application of protoplast fusion to the nonconventional yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 1: 45–51
- Larsson S., Nilvebrant N.O., Jonsson L.J. 2001. Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 1: 167–174
- Lentz M. 2018. The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. *Fermentation*, 4, 1, doi.10.3390/fermentation4010020: 13 str.
- Li M., Yang Z., Hao J., Shan L., Dong, J. 2008. Determination of tyrosol, 2-phenethyl alcohol and tyryptophol in beer by HPLC. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 66, 4: 245–249
- Lodolo E.J., Kock J.L., Axcell B.C., Brooks M. 2008. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, 8, 7: 1018–1036
- Maris A.J., Abbott D.A., Bellissimi E., Brink J., Kuyper M., Luttk M., Wisselink H., Scheffers W.A., Dijken J., Pronk J. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90, 4: 391–418
- McMurrough I., Madigan D., Donnelly D., Hurley J., Doyle A.-H., Hennigan G., McNulty N., Smyth M.R. 1996. Control of ferulic acid and 4-vinylguaiacol in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 102, 5: 327–332
- McMurrough I., Roche G.P., Cleary K.G. 1984. Phenolic acids in beers and worts, *Journal of the Institute of Brewing*, 90, 3: 181–187
- Meilgaard M.C. 1975. Flavor chemistry of beer: Part II: Flavour and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, 12, 3: 151–168
- Meusdoerffer F. 2009. *A Comprehensive History of Beer Brewing. V: Handbook of brewing: processes, technology, markets.* Eßlinger H.M (ur.). Weinheim, Wiley: 1–42
- Michel R., McGovern P., Badler V. 1992. Chemical evidence for ancient beer. *Nature*, 360, 24
- Mpofu A., Sapirstein H.D., Beta T. 2006. Genotype and environmental variation in phenolic content, phenolic acid composition, and antioxidant activity of hard spring wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4: 1265–1270
- Mukai N., Masaki K., Fujii T., Iefuji H. 2014. Single nucleotide polymorphisms of PAD1 and FDC1 show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118, 1: 50–55
- Mukai N., Masaki K., Fujii T., Kawamukai M., Iefuji, H. 2010. PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 6: 564–569
- Pavelka N., Rancati G., Zhu J., Bradford W.D., Saraf A., Florens L., Sanderson B.W., Hattem G.L., Li R. 2010. Aneuploidy confers quantitative proteome changes and phenotypic variation in budding yeas., *Nature*, 468, 7321: 321–325

- Purugganan M.D., Fuller D.Q. 2009. The nature of selection during plant domestication. *Nature*, 457, 7231: 843–848
- Rancati G., Pavelka N., Fleharty B., Noll A., Trimble R., Walton K., Perera A., Staehling Hampton K., Seidel C.W., Li R. 2008. Aneuploidy underlies rapid adaptive evolution of yeast cells deprived of a conserved cytokinesis motor. *Cell*, 135, 5: 879–893
- Selmecki A.M., Dulmage K., Cowen L.E., Anderson J.B., Berman J. 2009. Acquisition of aneuploidy provides increased fitness during the evolution of antifungal drug resistance. *PLOS Genetics*, 5, 10: e1000705, doi:10.1371/journal.pgen.1000705: 17 str.
- Sheltzer J.M., Blank H.M., Pfau S.J., Tange Y., George B.M., Humpton T.J., Brito I.L., Hiraoka Y., Niwa O., Amon A. 2011. Aneuploidy drives genomic instability in yeast, *Science*, 333, 6045: 1026–1030
- Shinohara T., Kubodera S., Yanagida F. 2000. Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 1: 90–97
- Steensels J., Daenen L., Malcorps P., Derdelinckx G., Verachtert H., Verstrepen J.K. 2015. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206: 24–38
- Steensels J., Snoek T., Meersman E., Picca M., Voordeckers K., Verstrepen K.J. 2014. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 5: 947–995
- Steensels J., Verstrepen K.J. 2014. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68: 61–80
- Taofiq O., González-Paramás A., Barreiro M., Ferreira I. 2017. Hydroxycinnamic acids and their derivatives: cosmeceutical significance, challenges and future perspectives, a review. *Molecules*, 22, 2, doi:10.3390/molecules22020281: 11 str.
- Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F.R. 2008. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107, 1: 221–230
- Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F.R. 2007. Variability in the release of free and bound hydroxycinnamic acids from diverse malted barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars during wort production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 26: 11002–11010
- Vanbeneden N., Van Roey T., Willems F., Delvaux F., Delvaux F.R. 2008. Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. *Food Chemistry*, 111, 1: 83–91
- Vanholme R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153, 3: 895–905
- Voordeckers K., Kominek J., Das A., Espinosa-Cantú A., De Maeyer D., Arslan A., Van Pee M., van der Zande E., Meert W., Yang Y., Zhu B., Marchal K., DeLuna A., Noort V.,

- Jelier R., Verstrepen K. 2015. Adaptation to high ethanol reveals complex evolutionary pathways. *PLOS Genetics*, 11, 11: e1005635, doi:10.1371/journal.pgen.1005635: 31 str.
- Vrhovnik U. 2019. Populacijska genomika avtohtonih kvasovk rodu *Saccharomyces* iz jabolčnega vina. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 68 str.
- Wannenmacher J., Gastl M., Becker T. 2018. Phenolic substances in beer: structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 4: 953–988
- Warringer J., Zörgö E., Cubillos, F.A., Zia A., Grassland A., Simpson J.T., Forsmark A., Durbin R., Omholt S.W., Louis, E.J., Liti G., Moses A., Blomberg A. 2011. Trait variation in yeast is defined by population history. *PLOS Genetics*, 7, 6: e1002111. doi:10.1371/journal.pgen.1002111: 15 str.
- Wunderlich S. in Back W. 2009. Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. V: *Beer in Health and Disease Prevention*, Victor Preedy (ur.). Amsterdam, Boston, Elsevier/Academic Press: 3–16
- Zastrow C., Hollatz C., de Araujo P., Stambuk B. 2001. Maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27, 1: 34–38