

105 - 370

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

broj 020-275

20.09 19 96 год.
НОВИ САД

Mr Siniša L. Markov

**IZUČAVANJE INTERMEDIJERA
U FERMENTACIJI
RAFINOZE I MELIBIOZE KVASCIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

370

Redni broj
RBR

Identifikacioni broj
IBR

Tip dokumentacije
TD Monografska publikacija

Tip zapisa
TZ Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada
VR Doktorska disertacija

Autor
AU Siniša L. Markov

Mentor/ko-mentor
MN

Naslov rada
NR IZUČAVANJE INTERMEDIJERA U FERMENTACIJI RAFINOZE I MELIBIOZE KVASCIMA

Jezik publikacije
JP Srpski (latinica)

Jezik izvoda
JI Srpski/engleski

Zemlja publikovanja
ZP Jugoslavija

Uže geografsko područje
UGP Vojvodina

Godina
GO 1996.

Izdavač
IZ Autorski reprint

Mesto i adresa
MA 21000 Novi Sad, Tehnološki fakultet,
Bulevar cara Lazara 1

KEY WORDS DOCUMENTACION

Accession number

ANO

Identification number

INO

Document type

DT Monographic publication

Type of record

TR Textual material, printed

Contents code

CC Ph.D. Thesis

Author

AU Siniša L. Markov

Menthor/co-Menthor

MN

Title

TI STUDY OF INTERMEDIATE COMPOUND IN
YEAST FERMENTATION OF RAFFINOSE AND
MELIBIOSE

Language of text

LT Serbian (Roman)

Language of abstract

LS Serbian/English

Country of publication

CP Yugoslavia

Locality of publication

LP Vojvodina

Publication year

PY 1996

Publisher

PB Author reprint

Publ. place

PL Novi Sad, Faculty of Technology,
Boulevard Cara Lazara 1

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

370

Redni broj RBR	
Identifikacioni broj IBR	
Tip dokumentacije TD	Monografska publikacija
Tip zapisa TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada VR	Doktorska disertacija
Autor AU	Siniša L. Markov
Mentor/ko-mentor MN	
Naslov rada NR	IZUČAVANJE INTERMEDIJERA U FERMENTACIJI RAFINOZE I MELIBIOZE KVASCIMA
Jezik publikacije JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda JI	Srpski/engleski
Zemlja publikovanja ZP	Jugoslavija
Uže geografsko područje UGP	Vojvodina
Godina GO	1996.
Izdavač IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa MA	21000 Novi Sad, Tehnološki fakultet, Bulevar cara Lazara 1

KEY WORDS DOCUMENTACION

Accession number	
ANO	
Identification number	
INO	
Document type	
DT	Monographic publication
Type of record	
TR	Textual material, printed
Contents code	
CC	Ph.D. Thesis
Author	
AU	Siniša L. Markov
Menthor/co-Menthor	
MN	
Title	
TI	STUDY OF INTERMEDIATE COMPOUND IN YEAST FERMENTATION OF RAFFINOSE AND MELIBIOSE
Language of text	
LT	Serbian (Roman)
Language of abstract	
LS	Serbian/English
Country of publication	
CP	Yugoslavia
Locality of publication	
LP	Vojvodina
Publication year	
PY	1996
Publisher	
PB	Author reprint
Publ. place	
PL	Novi Sad, Faculty of Technology, Boulevard Cara Lazara 1

Fizički opis rada	
FO	6 poglavlja, 77 strana, 116 lit.citata, 17 tabela, 27 slika
Naučna oblast	
NO	Biotehnologija
Naučna disciplina	
ND	Mikrobiologija
Predmetna odrednica / Ključne reči	
PO	Fermentacija, rafinoza, melibioza, kvasci
UDK	663.031.1/2:664.138
Čuva se	
CU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu; Bulevar Cara Lazara 1
Važna napomena	
VN	Nema
Izvod/Abstrakt	
IA	

Analizom podloge iz standardizovanog fiziološkog testa fermentacije rafinoze primenom HPTLC metode, utvrđeno je da se u podlozi javlja jedinjenje sa retencijom većom od rafinoze, dok svi konstituenti rafinoze imaju manju retenciju. Za nastajanje takvog jedinjenja tokom testa fermentacije rafinoze i njenih konstituenata kvascima nije bilo literaturne potvrde.

Ispitivano je kod kojih kvasaca i kod fermentacije kojih ugljenih hidrata se u podlozi javlja ispitivano jedinjenje. Zatim je ispitivana veza određenih parametara procesa fermentacije sa nastajanjem zapaženog jedinjenja. Pored toga, ispitivanom jedinjenju su, nakon izolovanja iz fermentacione podloge i prečišćavanja radi dobijanja čiste supstance, određeni neki elementi strukture.

Utvrdeno je da se samo kod kvasaca koji imaju fiziološko svojstvo fermentacije celog molekula rafinoze i svojstvo fermentacije melibioze tokom procesa javlja ispitivano jedinjenje i da je ono intermedijer metabolizma. Činioci značajni za proces fermentacije – inokulum (količina i podloge za njegovu pripremu), sastav podloge (sadržaj rafinoze i melibioze, kao i različiti izvori azota) i uslovi gajenja, varirani u odnosu na standardizovani fiziološki test fermentacije, ne prouzrokuju promenu kvalitativnog sastava jedinjenja u podlozi tokom fermentacije rafinoze i melibioze. Dakle, ispitani intermedijer je uvek prisutan u podlozi. Na povećanje njegovog sadržaja u podlozi utiče dodatak galaktoze tokom fermentacije rafinoze. Najveća koncentracija ispitivanog intermedijera (0,87 mg/ml) je trećeg dana fermentacije melibioze, odnosno drugog dana fermentacije rafinoze (1,48 mg/ml). Sadržaj ispitivanog intermedijera na kraju procesa fermentacije rafinoze je 6 puta veći nego kod melibioze (1,04 prema 0,17 mg/ml). Ispitivani intermedijer je redukujući ugljeni hidrat molekulske mase 504 što odgovara trisaharidima. Konstituenti ovog jedinjenja su glukoza i galaktoza koje su povezane najverovatnije α -tipom veze.

Physical description	
PD	6 chapters, 77 pages, 116 references, 17 tables, 27 figures
Scientific field	
SF	Biotechnology
Scientific discipline	
SD	Microbiology
Subject / Key words	
CX	Fermentation, raffinose, melibiose, yeast
UDK	663.031.1/2:664.138
Holding data	
HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad; Boulevard Cara Lazara 1

Abstract

AB

Analyzing the media from standardized physiological test for raffinose fermentation by means of HPTLC method, the appearance of a compound was registered with retention higher than that of raffinose or its constituents indicating also smaller retentions. No literature data were found for the formation of such a compound during fermentation tests for raffinose and its constituents.

It was investigated which yeast will indicate formation of the investigated compound in the course of fermentation as well as which carbohydrate during its fermentation will indicate the presence of this compound. Further investigation included correlation of particular parameters known as significant for the process of fermentation, with the appearance of the noticed compound. Moreover, some structural elements were also determined for the investigated compound, after isolation from fermentation media and purification in order to obtain pure substance.

It was proved that the investigated compound appeared just with the yeasts physiologically characterized by fermentation of entire molecule of raffinose as well as melibiose in the course of fermentation. This compound proved to be an intermediate compound of metabolism. Parameters significant for the process of fermentation - inoculum (size and media for its growth), media composition (content of raffinose and melibiose as different nitrogen source) and the condition of incubation, exchanged from the standardized physiological test of fermentation, didn't change qualitatively the compound composition in the media during raffinose and melibiose fermentation. Therefore, it is obvious that the investigated intermediate compound was present constantly in the media. Its content is effected by the addition of galactose in the course of raffinose fermentation. The highest concentration (0.87 mg/ml) of the investigated compound was registered on the third day of melibiose fermentation, i.e. the second day of raffinose fermentation (1.48 mg/ml). Content of the investigated intermediate compound at the end of raffinose fermentation was six times higher than of melibiose (1.04 in relation to 0.17 mg/ml). The investigated intermediate compound proved to be the reduced carbohydrate with molecular mass of 504 corresponding to trisaccharides. Constituents of this compound, glucose and galactose are probably connected by α -type of bonds.

Datum prihvatanja teme od strane NN Veća

DP

Datum odbrane

5. 12. 1936

DO

Članovi komisije

KO

Predsednik Prof. dr. J. Jakovljević

Član „ D. Pejin

Član „ Milobrod Stojanović - Polj

Član: „ D. Perić

Accepted by the Scientific Board on
ASB

Defended on
DE

Thesis defend board
DB

President _____

Member _____

Member _____

Member: _____

*„... the microbiologist is as much imbued with
the mysteriouness of life as any one else,
during moments of introspection and reflection“*

A.J. Kluyver

Izražavam iskrenu i najtopliju zahvalnost svom učitelju mikrobiologije, pokojnoj prof. dr Ljubici Vrbaški. Ona mi je teorijskim znanjem, bogatim laboratorijskim iskustvom, otvorenošću i podsticanjem na diskusiju pružala, kao mentor, veliku pomoć i podršku tokom izrade disertacije.

Posebnu zahvalnost izražavam dr Dušanki Pejin, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, koja je u datim okolnostima preuzela obaveze mentora, na njenom interesovanju i nesebičnoj želji da mi pomogne tokom završne faze ovog rada.

Dugujem zahvalnost dr Žiki Lepojeviću, docentu Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na pomoći u eksperimentalnom delu i diskusijama o problemima iz hemijskih područja.

Više od obične zahvalnosti izražavam dr Evi Lončar, docentu Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, i mr Ivanu Šeferu, asistentu Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na dragocenim savetima i pomoći prilikom definitivnog uobličavanja ovog rada.

Na kraju, zahvalnost dugujem svima onima koji su na bilo koji način pomogli da se ovaj rad dovede do kraja.

Siniša Markov

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1.	Usvajanje i fermentacija rafinoze i melibioze	3
2.1.1.	Neki hemijski aspekti rafinoze i melibioze	3
2.1.2.	Usvajanje rafinoze i melibioze kod kvasaca	5
2.1.3.	Fiziološki testovi fermentacije rafinoze i melibioze	6
2.1.4.	Analiza testa fermentacije	7
2.2.	Mehanizam usvajanja rafinoze i melibioze	8
2.2.1.	„Direktna“ i „indirektna“ fermentacija	8
2.2.2.	Transport ugljenih hidrata u ćeliju	11
2.2.3.	Katabolizam monosaharidnih konstituenata melibioze i rafinoze	14
2.2.4.	Neki aspekti genetike u fermentaciji melibioze i galaktoze	15
2.3.	α -Galaktozidaza	17
2.4.	Značaj fermentacije rafinoze i melibioze	19
3.	MATERIJAL I METODE	21
3.1.	Mikroorganizmi	21
3.2.	Podloge	23
3.3.	Fermentacija rafinoze, melibioze i drugih ugljenih hidrata i aerobno usvajanje rafinoze i melibioze	24
3.3.1.	Određivanje preostalih ugljenih hidrata standardizovanim metodama u fiziološkom testu fermentacije rafinoze i melibioze	25
3.3.2.	Određivanje preostalih ugljenih hidrata hromatografskom metodom u fiziološkom testu fermentacije rafinoze i melibioze	25
3.4.	Analiza fermentacionih uzoraka HPLC metodom	26
3.5.	Metode izolovanja i prečišćavanja	26
3.5.1.	Obrada fermentacionog uzorka	26

3.5.2.	Semipreparativna tankoslojna hromatografija	27
3.5.3.	Kolonska „flash“ hromatografija	27
3.5.4.	Kolonska hromatografija sa silikagelom H	28
3.5.5.	Acetilovanje uzorka	28
3.5.6.	Izdvajanje acetilovanog oblika ispitivanog intermedijera kolonskom hromatografijom	28
3.5.7.	Dezacetilovanje	29
3.6.	Određivanje strukture ispitivanog intermedijera	29
4.	REZULTATI I DISKUSIJA	30
4.1.	Preliminarna ispitivanja	30
4.1.1.	Analiza podloge u fiziološkom testu fermentacije rafinoze dugo čuvanim pivskim kvascima hromatografskom metodom	30
4.1.2.	Fermentacija melibioze i rafinoze pivskim kvascima iz vojvođanskih pivara i analiza podloge hromatografskom metodom	32
4.1.3.	Testiranje fermentacionih svojstava kvasaca prema konstituentima rafinoze	34
4.2.	Mikrobiološki aspekti	35
4.2.1.	Usvajanje melibioze i rafinoze kod pivskih kvasaca	36
4.2.2.	Fermentacija melibioze i rafinoze kod drugih kvasaca roda <i>Saccharomyces</i> i kvasaca drugih rodova	40
4.2.3.	Praćenje fermentacije galaktoze, saharoze, melibioze i rafinoze HPTLC metodom	44
4.3.	Neki aspekti procesa fermentacije rafinoze i melibioze	48
4.3.1.	Variranje inokuluma	49
4.3.2.	Variranje podloge	50
4.3.3.	Variranje uslova gajenja	53
4.3.4.	Određivanje sadržaja ispitivanog intermedijera u fermentacionim podlogama	55
4.4.	Izolacija i prečišćavanje intermedijera	58
4.5.	Određivanje strukture intermedijera	62
5.	ZAKLJUČCI	69
6.	LITERATURA	71

1. UVOD

Kvasac i fermentacija su pojmovi koji su direktno povezani. Na tu vezu ukazuje i etimologija reči kvasac u nizu jezika, jer koren te reči upućuje na penu ili stvaranje gasa u procesima označenim kao fermentacija. Sumarna jednačina alkoholne fermentacije, nazvana i Gay-Lussac-ova, definiše odnose dobijenog etanola i ugljen-dioksida iz šećera delovanjem kvasca. Eksperimenti velikana mikrobiologije Pasteur-a mnogo su proširili znanja o metabolizmu kvasaca i vrenju. Pre sto godina Buchner je izveo alkoholno vrenje sa sokom ćelija kvasaca i time demantovao stav da je vrenje manifestacija života. Radovi niza istraživača u prvoj polovini ovog veka doveli su do otkrića kojim redosledom i kakve se promene dešavaju sa molekulom glukoze u ćeliji kvasca da bi se dobili proizvodi fermentacije. Istraživanja usvajanja i razgradnje di- i trisaharida usledila su kasnije, a još uvek nema dovoljno podataka o usvajanju melibioze i rafinoze jer je fermentacija ovih šećera kvascima izučena samo kao jedna od standardnih fizioloških karakteristika u taksonomiji kvasaca. Međutim, nova saznanja o fermentaciji melibioze i rafinoze kvascima, ne privlače pažnju samo za potpuno poznavanje tog procesa već otvaraju mogućnosti aplikacije i konkretne primene u industriji, tj. ispitivanje ovih procesa ima značaja i van studija taksonomije kvasaca i genetike kvasaca.

Biologija kvasaca je jedna od osnova u industrijskoj mikrobiologiji zbog toga što su oni u nekim tradicionalnim, ili klasičnim tehnologijama primarni radni mikroorganizmi i zbog njihove primene u nizu savremenih biotehnoških procesa. S druge strane, melibioza i rafinoza su prirodni ugljeni hidrati prisutni u nizu sirovina, ali nisu dominantni tako da ne predstavljaju osnovni izvor ugljenika u nekom tradicionalnom fermentacionom postupku. Međutim, prisustvo ovih šećera u nekim sirovinama ometaju uobičajen tehnološki proces. Na osnovu iznetih činjenica danas se smatra da je fermentacija celog molekula rafinoze, a time i melibioze, bitna i poželjna osobina proizvodnih kvasaca. Svojstvo fermentacije rafinoze i melibioze je osobina genetski modifikovanog pivskog kvasca koji usvaja dekstrine iz slada. Aktuelna su istraživanja da se rekombinantnom DNA tehnologijom u pekarski kvasac ugradi svojstvo usvajanja rafinoze da bi se bolje iskoristila podloga od melase šećerne repe jer sadržaj ovog šećera u toj sirovini nije zanemarljiv.



U taksonomskim ispitivanjima kvasaca fermentacija rafinoze i melibioze pripada grupi ključnih fizioloških svojstava za razvrstavanje sojeva i vrsta. Izvanredni radovi Wickerham-a, sredinom ovog veka, na standardizaciji testova fermentacije su dali velik doprinos te se i danas za identifikaciju i klasifikaciju kvasaca koriste podloge i postupci koje je on uveo. Veoma malo savremenih metoda je standardizovano i njihova primena našla mesto u taksonomskim priručnicima.

Polazeći od stava da je u fiziološkom testu fermentacije za određivanje preostalih šećera u fermentisanoj podlozi jedna od pogodnih metoda hromatografija, preduzeta su ispitivanja fermentacije rafinoze sa tri dugo čuvana pivska kvasca primenom tankoslojne hromatografije visokog učinka. Preliminarnim ispitivanjem je utvrđeno da se u fermentacionoj podlozi pojavljuje i jedinjenje sa retencijom većom od rafinoze, dok svi njeni konstituenti imaju manju retenciju.

Poznato je da fermentacija kompletnog molekula rafinoze i melibioze kvascima pripada „indirektnim“ fermentacijama, jer je prvi korak hidroliza ovih šećera sa spoljašnje strane citoplazmine membrane. U fermentaciji rafinoze i melibioze zajedničko je da se veza između galaktoze i glukoze cepa hidrolitičkim enzimom – melibiazom. Za ovu hidrolazu je poznato da može katalizovati i druge tipove reakcija – reversnu hidrolitičku i transhidrolitičku reakciju. Međutim, da bi se odvijale te reakcije potrebni su određeni, vrlo specifični uslovi, a produkti ovih reakcija su najčešće oligosaharidi.

Nakon razgradnje rafinoze i melibioze sa spoljašnje strane osnovne membrane na heksozne konstituente, sledeći korak u procesu fermentacije je transport monosaharida u ćeliju kvasca. Završni korak je katabolizam tih šećera, u anaerobnim uslovima, do CO_2 i etanola.

Za nastajanje jedinjenja sa retencijom većom od rafinoze u fiziološkom testu fermentacije rafinoze kvascima nije bilo literaturne potvrde.

Na osnovu iznetih činjenica preduzeta su ispitivanja nastajanja zapaženog jedinjenja u fermentaciji rafinoze i melibioze kvascima sa mikrobiološkog i biotehnološkog aspekta, a cilj rada bio je sledeći:

- ispitivanje učestalosti nalaženja ispitivanog jedinjenja u podlogama standardizovanog testa fermentacije rafinoze, melibioze i njihovih konstituenata kod većeg broja različitih kvasaca;
- ispitivanje veze određenih parametara procesa fermentacije rafinoze i melibioze kvascima sa nastajanjem zapaženog jedinjenja;
- izolovanje i prečišćavanje ispitivanog jedinjenja radi dobijanja čiste supstance;
- određivanje elemenata strukture ispitivanog jedinjenja.



2. PREGLED LITERATURE

Literaturna razmatranja fermentacije rafinoze i melibioze profilisana su tako da sadrže ona pitanja koja su direktno ili indirektno povezana sa ciljem istraživanja. Izbor i redosled obrađenih pitanja sačinjen je na osnovu znanja o procesima koji se odvijaju prilikom testiranja kvasaca na sposobnost fermentacije rafinoze i melibioze. Kod obrade tih pitanja pristup je bio da se selektivno iznesu samo ona saznanja koja su u vezi sa fermentacijom rafinoze i melibioze kvascima. Dosadašnja istraživanja na problemu koji je predmet ovog rada nisu toliko brojna kao ispitivanja fermentacije nekih drugih šećera (npr. saharoze i maltoze) kvascima, pa zbog toga nije dat uobičajeni pregled literature.

Razmatranje usvajanja i fermentacije rafinoze i melibioze kao standardizovanih fizioloških svojstava kvasaca, mehanizma fermentacije ovih šećera i α -galaktozidaza, su pitanja koja su detaljnije obrađena. Posebno poglavlje predstavlja značaj fermentativne razgradnje rafinoze i melibioze jer ovo pitanje sve više dobija na važnosti u biotehnoškim procesima sa kvascima kao proizvodnim mikroorganizmom.

Pri navođenju kvasaca korišćena su imena vrsta koja su koristili istraživači u svom radu, mada ti nazivi ne odgovaraju aktuelnom taksonomskom priručniku (1) u kom je objedinjavanjem vrsta povećan broj sojeva. Sada su, na primer, pekarski i pivski kvasci svrstani u vrstu *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1. USVAJANJE I FERMENTACIJA RAFINOZE I MELIBIOZE

2.1.1. Neki hemijski aspekti rafinoze i melibioze

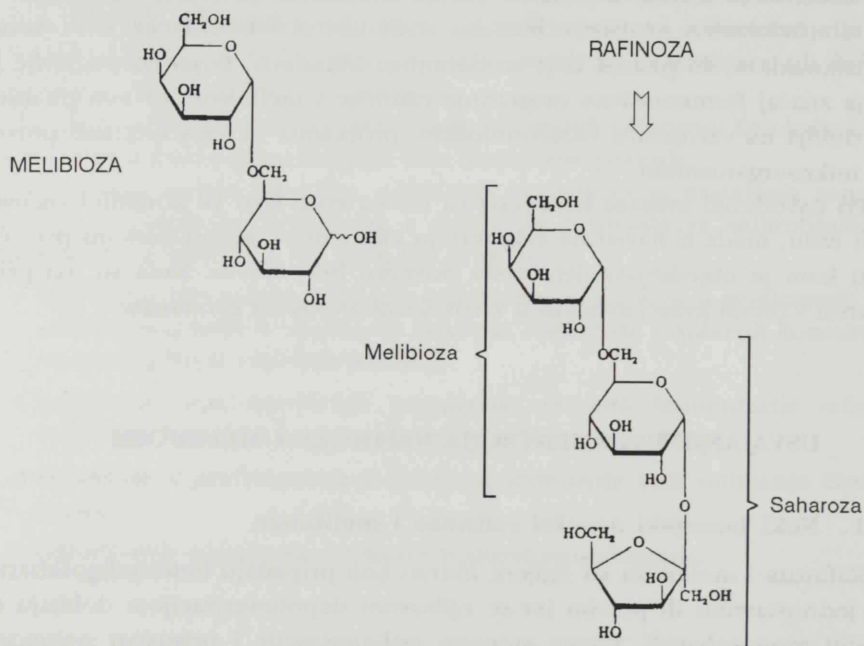
Rafinoza i melibioza su ugljeni hidrati koji pripadaju heterooligosaharidima i to jednostavnim ili pravim jer se njihovom depolimerizacijom dobijaju samo različiti monosaharidi. Prema stepenu polimerizacije i prisustvu poluacetalne grupe na kraju melibioza je redukujući disaharid, a rafinoza neredukujući trisaharid (2, 3).

Melibioza je sastavljena iz galaktoze i glukoze koje su povezane glikozidnom vezom maltoznog tipa (poluacetalna grupa galaktoze stupa u reakciju sa alkoholnom grupom glukoze), a rafinozu čine galaktoza, glukoza i fruktoza, tj. melibioza i fruktoza koje su povezane glikozidnim vezama trehaloznog tipa (reakcija poluacetalnih hidroksilnih grupa), što je predstavljeno na slici 1. Rafinoza bi se, sa druge strane, mogla posmatrati kao da je čine galaktoza i saharoza.

Prema nomenklaturi melibioza je 6-O- α -D-galaktopiranozil-D-glukoza (u skraćenom obliku α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp), a rafinoza je O- α -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glukopiranozil- β -D-fruktofuranozid (u skraćenom obliku α -D-Galp-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glcp-(1 \rightarrow 1)- β -D-Fruf).

Melibioza se dobija iz rafinoze fermentacijom sa pivskim kvascima gornjeg vrenja (4).

Rafinoza se u prirodi sreće kod velikog broja biljaka. Često je prisutna zajedno sa saharozom, ali u mnogo nižim koncentracijama, kao na primer, u šećernoj repi oko 0,05% i 1,9% u soji. Rafinoza je prvi član serije oligosaharida koja uključuje stahiozu (tetrasaharid) i verbaskozu (pentasaharid). Ovi šećeri se sintetizuju iz saharoze i jednog ili više D-galaktozil ostataka. Rafinoza se dobija direktnom kristalizacijom iz melase ili ekstrakcijom iz mleka od semena pamuka (otuda se još naziva i gosipoza, a sreću se još dva trivijalna naziva za nju: melitoza i melitrioza) (3-5).



Slika 1. Struktura melibioze i rafinoze

2.1.2. Usvajanje rafinoze i melibioze kod kvasaca

Ugljeni hidrati koje ćelije kvasaca usvajaju, razgrađuju se pa se oslobođena energija hemijskih veza akumulira u adenzin-trifosfatu (ATP), čime se obezbeđuje energija potrebna za životne funkcije ćelije. Usvojeni šećer ćelije kvasca iskoriste ili u respiraciji (aeroban proces označen i kao asimilacija) ili u fermentaciji. Konstatovano je za skoro sve kvasce ako neki šećer usvajaju fermentativno usvajajući ga i oksidativno, međutim u obrnutom smeru nema pravilnosti.

Pri usvajanju ugljenih hidrata dolazi do određenih promena, a one se mogu koristiti kao kriterijumi za odlučivanje da li dolazi do razgradnje ili ne. Te promene su smanjenje sadržaja šećera iz podloge, rast ćelija, povećanje usvajanja kiseonika, povećanje nivoa stvaranja CO₂ i etanola. U aerobnim uslovima uglavnom se na osnovu rasta ćelija odlučuje o pozitivnoj ili negativnoj reakciji, a kod fermentacije (anaerobnog usvajanja šećera) najčešće se na osnovu stvaranja gasa, CO₂, to konstatuje. Iako je fermentacija proces koji se odvija u anaerobnim uslovima, tj. proces u kojem se snižava nivo molekuskog kiseonika kod nekih kvasaca iz roda *Bretanomyces* i nekih drugih prisutan molekuskog kiseonik stimuliše fermentativne procese (6). Pored navedenih kriterijuma koji se koriste za utvrđivanje usvajanja nekog šećera može se koristiti i acidifikacija podloge (7).

Usvajanje ugljenih hidrata kod kvasaca uglavnom se ispituje u tečnim podlogama, ali asimilacija se može ispitivati i primenom čvrstih podloga – auksonografskom metodom. Za sva ispitivanja je zajedničko da podloge i uslovi gajenja moraju biti takvi da podržavaju optimalne uslove za manifestovanje životne aktivnosti ispitivane kulture kvasca (8).

Poznato je da kod kvasaca postoji razlika između usvajanja monosaharida i disaharida. U kojoj meri su izražene razlike između usvajanja monosaharida koji čine melibiozu i rafinozu i usvajanja njih samih mogu da ilustruju ispitivanja čiji je deo rezultata (7, 9) prikazan u tabeli 1.

Tabela 1. Asimilaciona i fermentaciona sposobnost kvasaca prema Barnett-u (7,9)

ugljeni hidrati	aerobni rast						anaerobna fermentacija					
	pozitivan		negativan		? ^a		pozitivna		negativna		? ^a	
D-glukoza	434 ^b	439 ^c	0	0	0	0	229	207	132	148	73	84
D-galaktoza	214	221	160	148	60	70	54	49	300	310	80	80
saharozna	264	258	136	152	34	29	109	80	272	295	53	64
melibioza	51	52	362	365	21	22	17	9	337	402	80	28
rafinoza	148	144	234	256	52	39	67	47	286	343	81	49

^a Označavanje „?“ korišćeno je za varijabilan rezultat koji se javlja:

- kada postoje razlike među sojevima jedne vrste;
- kada je u toku eksperimenta reakcija obeležena kao veoma slaba i
- kada nema prethodnih rezultata sa kojima bi se mogli uporediti.

^b Prema Barnett-u, 1976; ^c Prema Barnett-u, 1981.

Na osnovu rezultata u tabeli 1 zapaža se da od ispitivanih 434, tj. 439 vrsta kvasaca polovina asimilira galaktozu, a samo oko 25% od tih je i fermentira. Aeroban rast na saharozi ima 60% vrsta, dok je fermentacija prisutna kod četvrtine ispitanih vrsta. Tek pedesetak vrsta (oko 12%) asimilira melibiozu, ali samo oko 4%, tj. 2% je i fermentira. Kod rafinoze 33% ispitanih kvasaca pokazuje aeroban rast, a oko polovine od toga je i fermentira. Nisu dati podaci za fruktozu, ali ne treba zaboraviti na II zakon Kluyver-Dekker-a kojim je utvrđeno, bez izuzetaka, da kvasci koji fermentiraju D-glukozu takođe fermentiraju i D-fruktozu. Navedeni rezultati u tabeli 1 dobro ukazuju na kvantitativnu stranu ovih fizioloških osobina kod velikog broja vrsta, ali ne pokazuju na specifične slučajeve koji su opisani kod fermentacije ovih oligosaharida kvascima. Poznato je da pri pozitivnoj reakciji fermentacije melibioze ne moraju obe monosaharidne jedinice biti fermentisane već da je fermentisana samo glukoza, a to su npr. *Saccharomyces hienpiensis*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces inusitatus* i *Saccharomyces eupagycus* (9). Na osnovu sličnosti molekula melibioze i rafinoze smatra se da postoji veza između njihovih fermentacija, međutim, vidi se da je značajno manji broj vrsta koji fermentiraju melibiozu u odnosu na fermentaciju rafinoze. Smatra se da se svi kvasci koji fermentiraju melibiozu mogu razvrstati u 4 tipa: I) potpuna fermentacija rafinoze (npr. pivski kvasci donjeg vrenja, tj. *Saccharomyces uvarum*, zatim *Torulopsis samanticensis*); II) ne fermentiraju galaktozu, ali fermentiraju saharozu; III) ne fermentiraju ni galaktozu ni saharozu i IV) fermentiraju galaktozu, ali ne i saharozu (npr. *Saccharomyces oleaceus* i *Saccharomyces oleaginosus*, *Candida friedrichii*) (10). Posebnu grupu čine kvasci koji ne fermentiraju melibiozu, a fermentiraju rafinozu, tj. njenu fruktoznu jedinicu uz stvaranje melibioze. Takve osobine ima pekarski kvasac.

2.1.3. Fiziološki testovi fermentacije rafinoze i melibioze

Za određivanje fermentativnih svojstava kultura kvasaca postoje brojni tipovi eksperimenata kojima je zajedničko da se kao kriterijum za odlučivanje koristi izdvajanje CO₂. Prvu grupu čine kvalitativni ogledi koji se izvode ili u otvorenim (durhamove i Einhorn epruvete) ili zatvorenim sudovima (epruvete po Guerra). Drugu grupu čine uređaji tipa zatvorenih sudova koji omogućavaju kvantifikaciju, a to su razni fermentometri: Winge, tip šprica po Morris-u i Kirsop-u i kvantitativan po van Iterson-Kluyver-u (11).

Smatra se da su durhamove epruvete najčešće primenjive u rutinskoj upotrebi (12). Konstatovano je da primena Warburg-ove manometrijske tehnike ima prednosti u slučaju kada je fermentacija slaba, pa se ne može detektovati gas u durhamovoj epruveti. Međutim, takođe je konstatovano da u slučaju fermentacije kojoj prethodi formiranje indukovanih enzima ne treba donositi zaključke na osnovu primene Warburg tehnike već treba paralelno uraditi i rutinski test u durhamovoj epruveti (11).

Bez obzira na to koji tip eksperimenta će se primeniti, on mora biti standardizovan, moraju se koristiti šećeri visokog stepena čistoće (osobito bez

tragova trehaloze iz kvašćevog ekstrakta) i u izvođenju ogleda mora se rigorozno pridržavati opisane procedure, jer su tek tada rezultati validni (12).

Podloge se zasejavaju fiziološki aktivnom kulturom. Za ispitivanje fermentacije potreban je što gušći inokulum čime se brzo limitira raspoloživi kiseonik i ograničava se razmnožavanje. S druge strane, ograničavanje ćelijske proliferacije je nepoželjno kada je za fermentaciju potrebno formiranje adaptivnih enzimskih sistema (11, 12).

U brojnim studijama o kvascima (11-13) sreće se formulacija da je melibioza relativno skupa, pa da njenu fermentaciju treba određivati jedino kada je utvrđeno da se fermentira rafinoza ili kada je poznato da ispitivani soj asimilira melibiozu.

2.1.4. Analiza testa fermentacije

Inkubiranje je na temperaturi od 25 do 28°C uz povremeno mešanje i vizuelni pregled za utvrđivanje količine gasa i/ili promene boje indikatora. Vreme inkubiranja je 21 dan (11), tj. 14 dana (12). U zavisnosti od vremena potrebnog za formiranje vidljive količine gasa, kao i količine stvorenog gasa, nivo fermentacije se može klasifikovati kao:

- brz (najveći deo CO₂ se akumulira za 1-2 dana), srednji, spor (11);
- brz (najveći deo CO₂ se akumulira za 1-3 dana, a oznaka je +), slab (delimično ispunjena epruveta sa CO₂, a oznaka je +w), veoma slab (samo mehurići, a oznaka je +vw) i spor (gasom je ispunjena epruveta, ali kroz odloženo vreme, a oznaka je +s) (12).

Kod monosaharida, saharoze i nekih homooligosaharida (kao što su maltoza, maltotrioza i trehaloza) rezultati testa su konačni bez dodatnih analiza. Međutim, kod heterooligosaharida kao što su melibioza i rafinoza po završetku testa potrebno je proveriti da li su fermentisane sve monosaharidne jedinice koje grade molekule tih jedinjenja. U slučaju nekompletne fermentacije moraju se determinisati zaostali mono- ili disaharidi. Rezidualni šećeri se identifikuju hemijskim ili mikrobiološkim metodama ili njihovom kombinacijom. Te metode su standardizovane kao i kriterijumi za ovakva određivanja (11). U grupi hemijskih metoda samo je napomenuto da bi se fermentisane podloge mogle analizirati hromatografski i date su neke literaturne reference za to. Interesantno je da hromatografsku metodu koristi i urednik II izdanja „The Yeasts. A Taxonomic study“ (14) Jacomina Lodder u svom radu (15). Pored toga, na osnovu pregleda nekih od predloženih referenci (16, 17) zapaža se da je to metoda hromatografije na hartiji (PC). Hromatografija na tankom sloju (TLC), koja je razvijena 60-ih godina ovog veka, ima niz prednosti u odnosu na PC kao što su veća moć razdvajanja, veća brzina izvođenja i 10-20 puta manja količina nekog jedinjenja se može detektovati (18). Međutim, TLC takođe nije standardizovana u taksonomskim priručnicima, pa bi se na osnovu mogućnosti koje pruža moglo reći da je zapostavljena. Na osnovu ušteda u vremenu i materijalu za određivanje rezidualnih šećera mogla bi da bude jedna od najboljih metoda (19).

2.2. MEHANIZAM FERMENTACIJE RAFINOZE I MELIBIOZE

2.2.1. „Direktna“ i „indirektna“ fermentacija

Fermentacija oligosaharida je, pre svega, uslovljena sa postojanjem genetski kontrolisanog enzimskog sistema koji posreduje u hidrolizi glikozidnih veza stvarajući monosaharide koji se fermentiraju. Nije poznat ni jedan slučaj direktnog ulaska oligosaharida u metaboličke cikluse u ćeliji. Međutim, šta je prvi korak u njihovoj fermentaciji, hidroliza ili unošenje oligosaharida u ćeliju, jeste pitanje koje je dugo vremena bilo predmet pažnje istraživača (13, 20, 21). U početku je preovlađujući stav bila hipoteza Fischer-a i Armstrong-a, nazvana „teorija hidrolaza“, da kvasci uvek hidrolizuju disaharide i multisaharide pre fermentacije, tj. da je kod njih prisutna „indirektna“ fermentacija. U drugoj četvrtini ovog veka, mnoge iznete činjenice bile su u suprotnosti sa takvim pristupom. Naime, brža fermentacija laktoze od smeše glukoze i galaktoze, potom razlika između izdvojenih hidrolaza i intaktnih ćelija, tj. između *in vitro* i *in vivo* modela i niz drugih zapažanja naveli su istraživače da zaključe da fermentacija može teći bez delovanja hidrolaza u spoljašnjoj sredini, tj. da fermentacija oligosaharida može biti i „direktna“ (9). Osobita potpora ovakvoj hipotezi bila je činjenica da ima disaharida koje kvasac asimilira, ali ne fermentira (22). U tim ispitivanjima indirektno/direktno fermentacije, melibioza i rafinoza nisu bile toliko u centru ispitivanja koliko su to saharoza i maltoza.

Za molekul rafinoze može da se kaže da je sastavljen od melibioze i fruktoze koje su povezane istim tipom veze kao glukoza i fruktoza u molekulu saharoze. Na osnovu toga može se zaključiti da razrešenje pitanja šta je inicijalni korak u fermentaciji saharoze bio je i odgovor za deo molekula rafinoze. Na osnovu radova Lampen-a i saradnika (23) za enzim β -fruktozidazu (invertazu), konstatovano je da je neki kvasci izlučuju u podlogu, a kod većine se ona nalazi sa spoljašnje strane osnovne ćelijske membrane (24). U tom periodu je predloženo da se sposobnost fermentacije 1/3 molekula rafinoze može koristiti kao indeks invertazne aktivnosti, jer je odnos pH/aktivnost kod fermentacije i hidrolize isti (13). Na osnovu niza ispitivanja zaključeno je da anaerobno usvajanje β -D-fruktofuranozida (što je saharoza i deo molekula rafinoze) obuhvata hidrolizu sa spoljašnje strane osnovne membrane (25, 26). Pored toga, utvrđeno je da se proces hidrolize β -fruktofuranozidazne veze odvija 100 puta brže nego što je nivo usvajanja oslobođenog monosaharida (27).

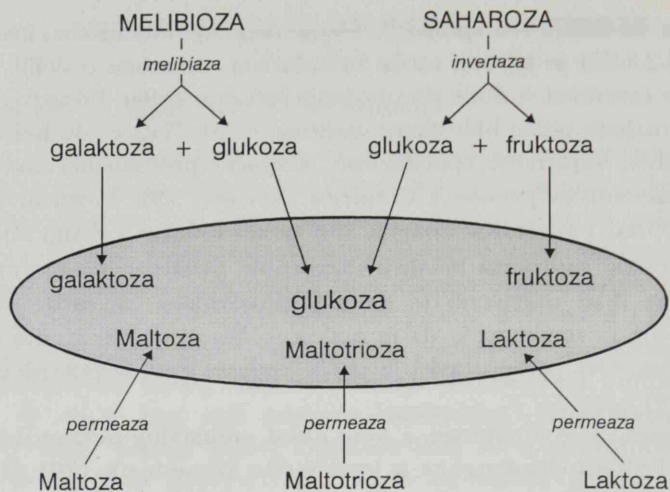
Za deo molekula rafinoze koji predstavlja saharozu treba istaći da nije samo β -D-fruktofuranozid pa da njegovu hidrolizu katalizuje samo β -D-fruktofuranozidaza. Ovaj deo molekula je istovremeno i α -D-glukopiranozid što znači da hidrolizu može da katalizuje i α -D-glukozidaza. Barnett (28) je objavio da 26% od 497 sojeva kvasaca različitih vrsta usvaja saharozu i da je kod njih pri hidrolizi izražena aktivnost α -D-glukozidaze. Treba napomenuti, da ovaj enzim pripada grupi enzima koji su unutar osnovne membrane ćelije i tu ispoljava svoju aktivnost, iako se kod nekih kvasaca kao što je *Saccharomyces logos*

pretpostavlja da deluje i sa spoljašnje strane osnovne membrane. Enzim α -glukozidaza (EC. 3.2.1.20) je taj koji može hidrolizovati saharozu u ćeliji, ako ispitivani kvasac nema invertazu, a dođe do unošenja šećera u ćeliju. Prisustvo ovog enzima, nazivanog i maltaza pošto hidrolizuje maltozu, ne znači da će do hidrolize saharoze uvek doći zbog supstratne specifičnosti, a tipični predstavnici takvih kvasaca su *Schizosaccharomyces pombe* i *Candida albicans* (9). U istom radu se konstatuje da pored navedenog enzima kod nekih kvasaca i drugi enzimi iz grupe α -glukopiranozid hidrolaza katališu razgradnju saharoze na monosaharide. Početkom ovog veka otkriveno je da α -D-glukozidaza ne može da hidrolizuje rafinozu, a pretpostavljeno je da je razlog to što je na C6 atomu prisutna veza sa galaktozom. Ova pretpostavka je posle pedeset godina potvrđena kod *Sacch. cerevisiae* (9).

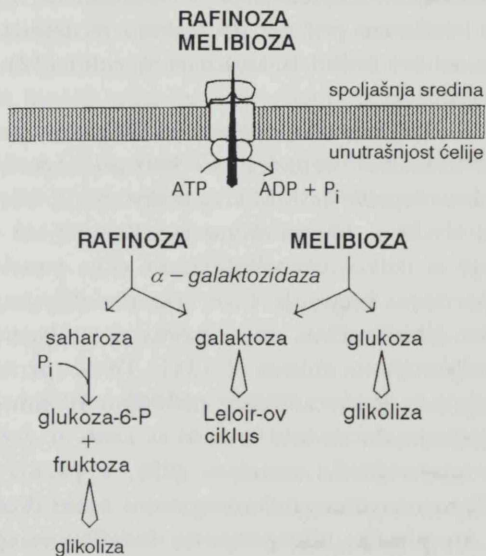
Kod fermentacije melibioze, a time i kod preostalog dela molekula rafinoze, istraživanja Friis-a i Ottolenghi-a iz karlsberške laboratorije (29) su pružila takve dokaze da se i posle tridesetak godina citiraju (30). Zaključak je ovih istraživača da je melibiazna (α -galaktozidazna) aktivnost locirana u ćelijskom zidu, tj. u spoljašnjem delu ćelije.

Na osnovu iznetog može se konstatovati da je kod kompletne fermentacije melibioze i rafinoze ispitivanim kvascima, a to su pre svega pivski kvasci donjeg vrenja, potom drugi sojevi roda *Saccharomyces* kao i sličnih rodova, prvi korak hidroliza sa spoljašnje strane osnovne membrane, za razliku od fermentacije maltoze i laktoze koje se prvo unose u ćeliju, što je šematski prikazano na slici 2 (31). Dakle, fermentacija melibioze i fermentacija celog molekula rafinoze pripada grupi „indirektnih“ fermentacija. Za razliku od kvasaca, kod bakterija usvajanje melibioze i rafinoze počinje prolaskom molekula kroz citoplazmatsku membranu i potom se ovi šećeri hidrolizuju u ćeliji (32), što ilustruje slika 3 (33).

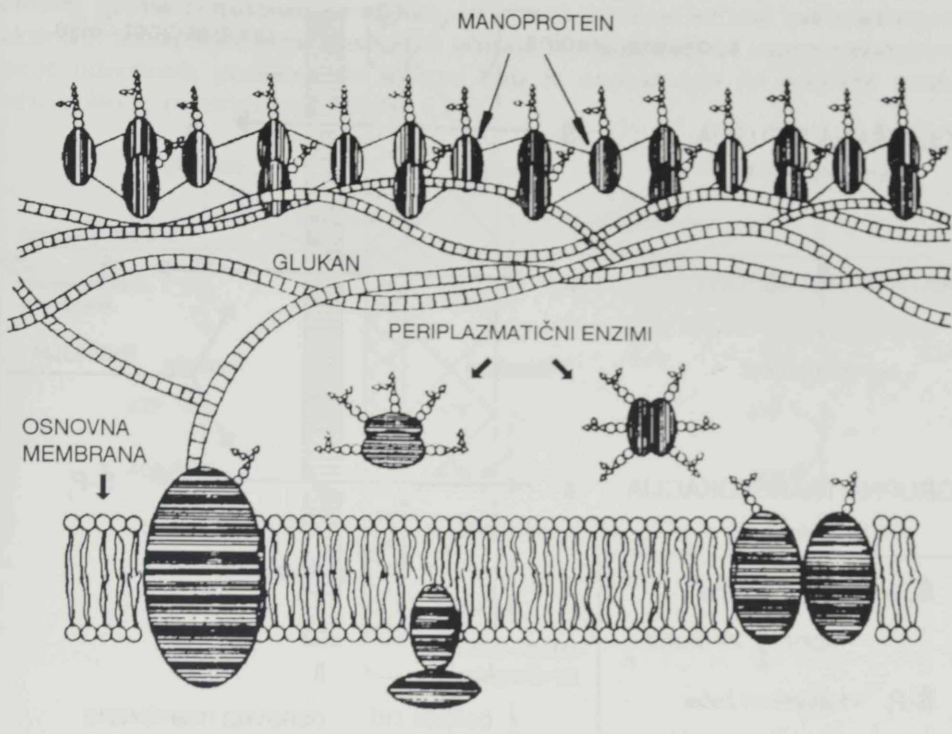
Oba enzima čije hidrolitičko dejstvo se smatra prvim korakom u fermentaciji melibioze i rafinoze kvascima, označeni su kao „eksternalni“ (23, 24). Kada se na pogodan način dezintegriše ćelijski zid, iz stvorenih sferoplasta se izlučuju ti enzimi u spoljašnju sredinu. Istovremeno sadržaj enzima unutar sferoplasta je veoma nizak, dok je u izdvojenom ćelijskom zidu izrazito viši u odnosu na sferoplast (9). Za precizno lociranje invertaze i melibiazne postoje dve mogućnosti. Prema jednim istraživačima ovi enzimi se nalaze u periplazmatičnom prostoru što je predstavljeno slikom 4 (34). To je prostor između osnovne membrane i ćelijskog zida kvasaca, širine približno 10 nm i zapremine oko 1 fl. Drugi istraživači smatraju da su ovi enzimi u samom ćelijskom zidu i da su, prema jednim, tu samo fizički zadržani (23), a prema drugima, da su vodoničnim vezama ili mostovima sa D-manoznom fosfo diestrom povezani (35). Interesantno je da to pitanje nije potpuno razjašnjeno pa se i u najnovijim radovima opisuje da su ta dva enzima u periplazmatičnom prostoru ili u ćelijskom zidu kvasca ili na oba mesta i da je deo enzima izlučen u spoljašnju sredinu (36).



Slika 2. Šematski prikaz usvajanja di- i trisaharida kod kvasaca roda *Saccharomyces* prema Panchal-u i saradnicima (31)



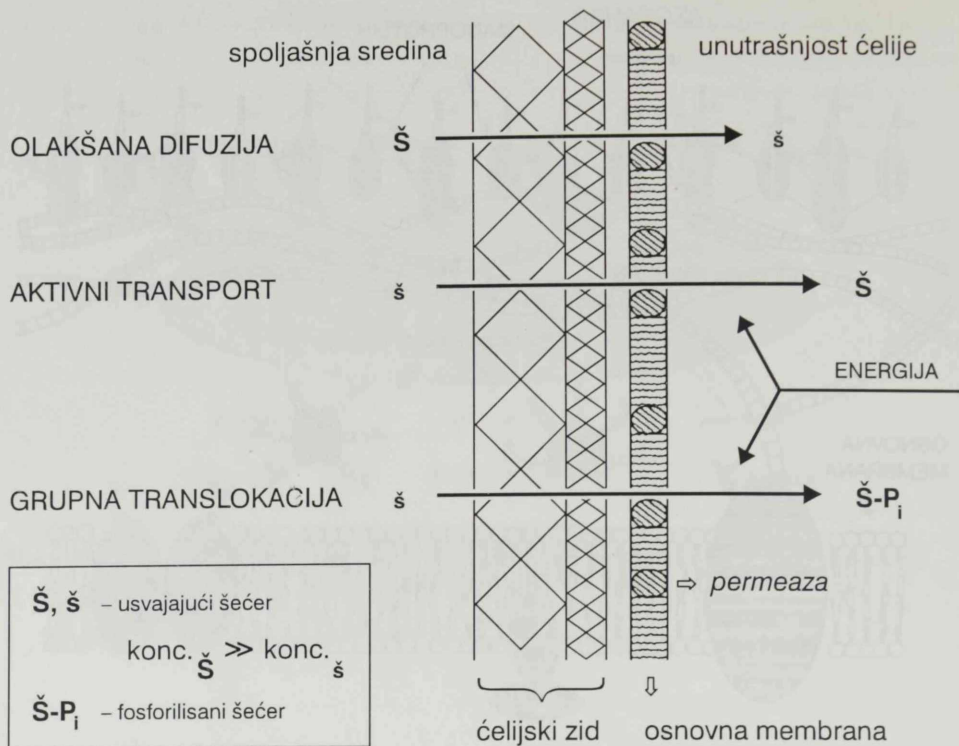
Slika 3. Šematski prikaz usvajanja melibioze i rafinoze kod bakterija mlečne kiseline prema Poolman-u (33)



Slika 4. Šematski prikaz ćelijskog zida i osnovne membrane u ćeliji kvasca prema Schekman-u i Novick-u (34)

2.2.2. Transport ugljenih hidrata u ćeliju

Da bi se monosaharidi (glukoza, fruktoza i galaktoza) nastali iz melibioze i rafinoze delovanjem hidrolaza, razgradili u ćeliji kvasca, potrebno je da se unesu u ćeliju. Znači da je usvajanje monosaharida, a time i razgradnja pri niskoj koncentraciji kiseonika, povezano sa prisustvom transportnog sistema kojim se obavlja unošenje šećera u ćeliju. Sposobnost transporta šećera u unutrašnjost ćelije je direktno genetski kontrolisana (7, 9, 36). Ćelijska membrana je nepropustljiva za monosaharide, pa je pasivni transport (difuzija i osmoza) isključen. Da bi došlo do transporta šećera iz podloge u ćeliju, potrebni su određeni nosioci u ćelijskoj membrani (37-39). Kakav je transport kod kvasaca moguć u zavisnosti od utrošene energije i stvorene razlike u koncentracijama šećera predstavljeno je na slici 5 (7). Zapaža se da je mehanizam transporta šećera različit i odvija se putem: olakšane difuzije, aktivnog transporta i grupnom translokacijom. Treba napomenuti da i pitanje transporta nije potpuno razjašnjeno (40). U svetu mikroorganizama postoji raznolikost tipova aktivnog transporta ugljenih hidrata u ćeliju. Kod kvasaca se ostvaruje jednim tipom, dok se kod bakterija sreće veći broj tipova (41).

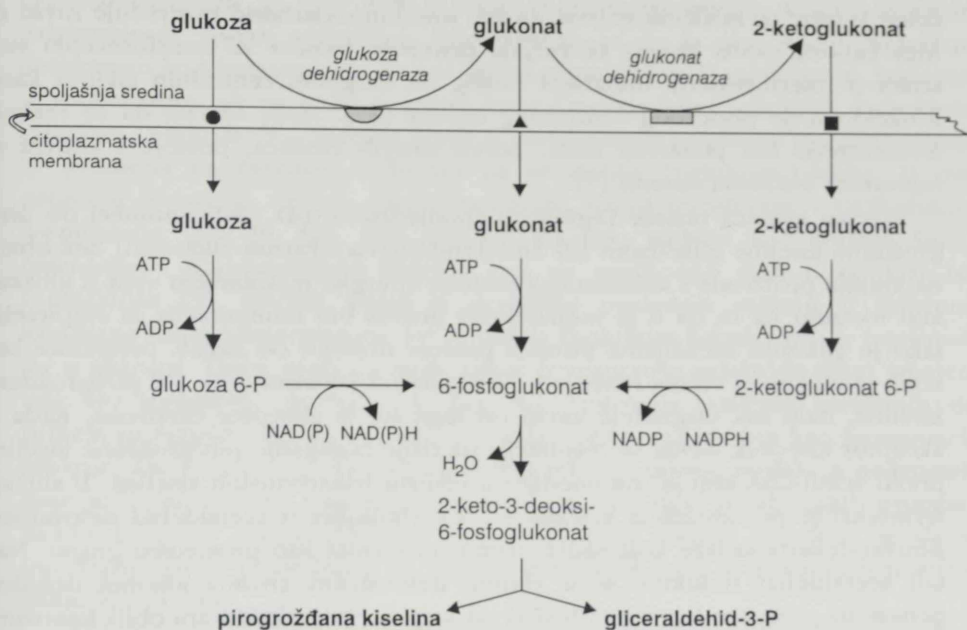


Slika 5. Šematski prikaz unošenja šećera u ćeliju kvasca

Prolazak šećera iz rastvora kroz permeabilnu ćelijsku membranu ostvaruje se makromolekulima koji pokazuju svojstva slična enzimima. Naime, nosioci, koji se nazivaju i permeaze (39), su proteini koji stvaraju komplekse sa svojim šećerima, pokazujući saturacionu kinetiku (38). Često je u jednoj ćeliji prisutno više nosioca za neki šećer, što znači da je prisutna preklapajuća specifičnost, ali je isto tako prisutna i široka supstratna specifičnost. Pored ovoga, nosioci mogu biti inducibilni i represivni (7, 9). Treba istaći da, iako je veoma mnogo studiran ulazak monosaharida kod *Sacch. cerevisiae*, priroda, broj, genetski aspekti nosioca, kao i činioci koji utiču na njih, predstavljaju i danas polje istraživanja (30).

Za ulazak glukoze, kod *Sacch. cerevisiae*, predložena su sva tri nabrojana mehanizma transporta (40). Smatra se da se kod glukoze on odvija uglavnom olakšanom difuzijom (40), ali neki rezultati upućuju i na grupnu translokaciju (42). Kod unošenja glukoze postoje najmanje tri nosioca veoma različita po supstratnoj specifičnosti (7). Kod kvasaca koji brže fermentiraju D-fruktozu nego D-glukozu, suprotno od fermentativnih svojstava pekarskih i pivskih kvasaca, otkriveno da jedan isti nosioc u ćelijskoj membrani za ova dva šećera ima veći

afinitet prema D-fruktozi. Za razliku od kvasaca glukoza se kod bakterija unosi aktivnim transportom (mehanizmom grupne translokacije) uz istovremeno odvijanje određenih promena na glukozi koja je neposredno do osnovne membrane, što je predstavljeno slikom 6 (43).



Slika 6. Šematski prikaz alternativnih perifernih puteva katabolizma glukoze kod *Pseudomonas aeruginosa* i *P. putida* prema Cuskey-u i saradnicima (43)

Transport fruktoze u ćeliju odvija se istim nosiocima kao za glukožu, ali postoje i specifični nosioci za ova dva monosaharida čija razlika nije samo u tipu šećera već i prema afinitetu ka supstratu jer za glukožu je karakterističan nosioci velikog afiniteta, a za fruktozu malog afiniteta (44).

Ulazak D-galaktoze u ćelije kvasaca, iz roda *Saccharomyces*, ostvaruje se olakšanom difuzijom pomoću nosioca široke specifičnosti za monosaharide koji imaju mali afinitet prema D-galaktozi (7). Pored toga, postoji jedan specifičan sistem za transport galaktoze koji se može inhibirati drugim fermentativnim šećerima (45). Neki eksperimentalni rezultati, od pre dvadesetak godina, upućivali su na pretpostavku da se deo D-galaktoze unosi aktivnim transportom uz istovremenu fosforilaciju tj. grupnom translokacijom (9).

Da se ulazak organskih supstanci u ćelije kvasca ne odvija pretežno olakšanom difuzijom već i aktivnim transportom (po tipu „proton symport“) primer su neke kiseline (limunska, sirćetna i pirogvoždana) kod kvasaca *Sacch. cerevisiae* i *Candida utilis* (46).

2.2.3. Katabolizam monosaharidnih konstituenata rafinoze i melibioze

Metabolizam monosaharida u ćeliji kvasaca je oblast koja se nalazi u standardnim udžbenicima iz biohemije pa stoga u ovom radu neće biti detaljno opisan, već će biti izdvojeni samo neki aspekti ove složene materije. Sposobnost ćelije kvasca, tj. različitih sojeva, da već uneti monosaharid razgrađuje zavisi od niza činioca među kojima se izdvaja prisustvo enzima za transformaciju supstrata u intermedijerni metabolit nekog od mogućih centralnih ciklusa kao i funkcionisanje podesnog centralnog ciklusa (47). Može se reći da će reakcija fermentacije biti pozitivna kada, pored drugih činilaca, postoje i aktivni su relevantni enzimski sistemi (7).

Većina kvasaca razlaže D-glukozu (podjednako α -D i β -D anomer) do pirogroždane kiseline glikolizom (ili Embden-Meyerhof-Parnas ciklusom) bez obzira na krajnje proizvode i količinu oslobođene energije raskidanjem veza u glukozu, koji ukazuju na to da li je metabolitski proces bio fermentacija ili respiracija. Iako je glikoliza esencijalna putanja postoje mutanti od *Sacch. cerevisiae* kod kojih je blokirana većina reakcija u nizu glicerid-3-fosfata (48). Od pirogroždane kiseline, dalji tok razgradnje zavisi od toga šta je akceptor elektrona. Kada je akceptor kiseonik odvija se respiracija uz dalje razlaganje pirogroždane kiseline preko acetil-CoA koji je intermedijer u ciklusu trikarbonskih kiselina. U slučaju fermentacije pirogroždana kiselina se dekarboksilira u acetaldehid delovanjem piruvat-dekarboksilaze koja sadrži tiamin pirofosfat kao prostetsku grupu. Nastali acetaldehid redukuje se u etanol, delovanjem enzima alkohol dehidrogenaze uz prisustvo koenzima NADH od koga nastaje oksidovani oblik koenzima (NAD). Energetski bilans alkoholnog vrenja vrlo je sličan bilansu glikolize jer su ATP i glukoza povezani odnosom 2:1. U alkoholnoj fermentaciji pored etanola formira se i CO_2 . Iz jednog molekula glukoze prvi i drugi C-atom daju jedan molekul etanola, dok drugi molekul etanola nastaje od petog i šestog C-atoma, a od trećeg i četvrtog C-atoma nastaju 2 molekula CO_2 (7).

Fruktoza prisutna samo u molekulu rafinoze, takođe se razlaže glikolizom. Početni intermedijeri su fruktoza-fosfati pa se preko D-fruktoza-6-fosfata uključuje u dalji tok glikolize do pirogroždane kiseline ili pak ulazi u pentozni ciklus (9).

Ispitujući fermentaciju heksoza i drugih ugljenih hidrata Pasteur je zapazio da se ona odvija u anaerobnim uslovima i da se aerisanjem kulture ona prvo smanjuje pa posle nestaje, a javlja se respiracija (49). Pojava da se fermentativan način usvajanja šećera inhibira kiseonikom nazvana je Pasteur-ov efekat (sreću se još i nazivi Pasteur-ov fenomen i Pasteur-ova reakcija) (50). Kod alkoholne fermentacije kvasaca zapažene su još dve pojave koje su označene i kao negativan Pasteur-ov efekat (51). Prva je da do alkoholne fermentacije dolazi i u prisustvu vazduha ukoliko je koncentracija glukoze veća od 1%, a ta pojava se naziva Crabree-ov efekat (52). Alkoholna fermentacija u striktno aerobnim uslovima koja se inhibira sa prelaskom u anaerobne uslove je druga pojava koja je nazvana Custers-ov efekat (53).

Kod galaktoze, konstituenta melibioze i rafinoze, prvi korak u razgradnji je fosforilacija koja je katalizovana galaktokinazom (EC 2.7.1.6) i nastaje galaktoza-1-fosfat. Pre toga, treba spomenuti aktivnost enzima, aldoza 1-epimeraze, koji konvertuje β -D-galaktozu u α -D-anomer (u vodenom rastvoru ravnoteža za D-galaktopiranozu je oko 27% u vidu α -anomera) prema kojem je enzim galaktokinaza visoko specifičan. Interesantno je da je ovaj enzim uglavnom detektovan kod kvasaca kada su oni gajeni u podlozi sa D-galaktozom, laktozom ili melibiozom, ali ne i ako je jedini izvor C-atoma bila D-glukoza, D-fruktoza, saharoza i maltoza (9). Naredni korak u metabolizmu galaktoze je epimerizacija, tj. promena na četvrtom C-atomu pa se dobija D-glukoza-1-fosfat. U ovoj promeni učestvuju enzimi galaktoza-1-fosfat uridil transferaza i UDP-glukoza 4-epimeraza (33, 39, 54). Oba ova enzima nisu nađena kod kvasaca *Sacch. cerevisiae* i *Kluyveromyces fragilis* koji su prethodno rasli u podlozi bez D-galaktoze (9). Sledeći korak je praktično poslednja reakcija u pripremi, katalisana fosfoglukomutazom, jer se dobija D-glukoza-6-fosfat koji je intermedijer u glikolizi. Treba istaći da mehanizam fermentacije galaktoze dugo vremena nije bio kompletno poznat (13, 22). Niz ispitivanja različitih istraživača doprinela su razjašnjenju da fermentacija galaktoze nema isti put kao fermentacija glukoze. Da je suština u fosforilaciji i preuređenju takvog molekula nedvosmisleno je utvrdio Leloir i saradnici pa se stoga ovaj deo metaboličkih procesa i naziva Leloir-ov ciklus (55). Za enzime iz ovog ciklusa utvrđeno je da su induktivni, osim poslednjeg, tj. fosfoglukomutaze koja je konstitutivni enzim ćelije kvasca (54).

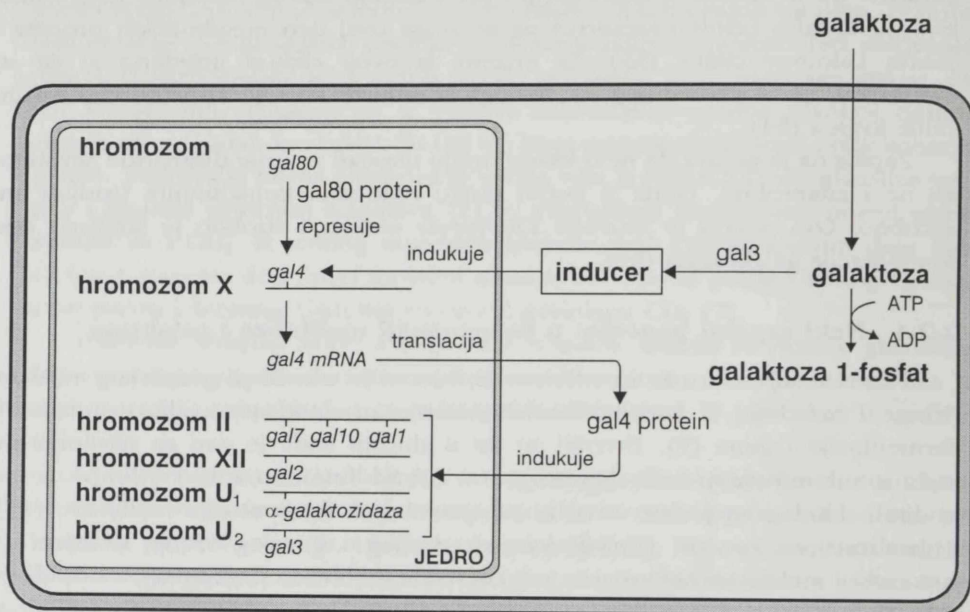
Zapažena je pojava da neki kvasci mogu usvajati izvesne disaharide aerobno, ali ne i anaerobno, mada ti kvasci mogu heksozne konstituente usvajati anaerobno. Ova pojava je nazvana Kluyver-ov efekat, a osobito je izražena kod fermentacije galaktozida (56).

2.2.4. Neki aspekti genetike u fermentaciji melibioze i galaktoze

Fermentacija rafinoze i melibioze ispitivana je takođe sa genetskog aspekta. Winge i saradnici iz karlsberške laboratorije su dosta ispitivali vezu između fermentacije i gena (9). Utvrdili su da u slučaju kada je gen za fermentaciju rafinoze dominantan tada heterozigotni hibrid fermentira kao i homozigotni roditelj. Lindegren je isto utvrdio za sposobnost fermentacije melibioze (13). Hibridizacijom između pivskih kvasaca donjeg i gornjeg vrenja dobijeni su anaerobni melibioza nefermentujući i aerobni melibioza fermentujući hibridi (9, 13). Na osnovu ovih rezultata proistekla je dilema da li je fermentacija melibioze fundamentalna razlika između kvasaca donjeg i gornjeg vrenja (57). Može se reći da su ovi rezultati, objavljeni pre više od četrdeset godina, bili prvi nagoveštaj da fermentacioni model ne bi trebalo da bude primaran u razvrstavanju vrsta. Utisak je da ovi rezultati pokazuju filogenetsku bliskost kvasaca donjeg i gornjeg vrenja, međutim time se ne umanjuje značaj proizvodnih razlika između tih kvasaca.

Genetska istraživanja kod vrsta roda *Saccharomyces* upućuju na prisustvo i polimorfnost MEL gena, tj. gena koji preko α -galaktozidaze kontrolišu fermentaciju melibioze (58). Multipla genska kontrola nije izuzetak već je dokumentovana i opisana za niz enzima kvasaca, kao što je i maltaza ili α -glukozidaza (59, 60). Kod pivskih kvasaca opisano je 9 MEL lokusa, 5 su nađena kod jednog soja a 7 kod drugog soja dajući ukupno 10 definisanih MEL lokusa kod *Sacch. cerevisiae* (61). Ova familija gena takođe je povezana sa kontrolom fermentacije maltoze, metil- α -glukozida, saharoze i skroba (58). Dva MEL gena su klonirana i sekvencionirana i to MEL1 gen iz nepivskog kvasca i MEL gen iz tipskog soja *Saccharomyces. carlsbergensis* NCYC 396, a MEL geni drugih mikroorganizama (*E.coli*, *Aspergillus* sp.), biljaka (*Cyamopsis tetragonolobe*) i čoveka su takođe klonirani i sekvencionirani (62).

Kod usvajanja galaktoze poznato je nekoliko gena lociranih na različitim hromozomima (slika 7), ali još nije potpuno jasno kako je regulatorni protein od gena gal 80 povezan sa DNA (39). Zapaženo je da se javlja represija transkripcije gal gena, odgovornih za unošenje galaktoze u ćelije *Sacch. cerevisiae*, kada se gaji na glukozi ili fruktozi ali ova pojava nije objašnjena (63).



Slika 7. Mehanizam genetske regulacije usvajanja galaktoze prema Lodish-u i saradnicima (39)

2.3. α -GALAKTOZIDAZA

U fermentaciji rafinoze i melibioze prva reakcija je enzimska hidroliza ovih ugljenih hidrata. Za oba šećera zajednička je aktivnost enzima α -galaktozidaze, pa će stoga u narednom tekstu predmet pažnje biti neki aspekti ovog enzima.

Enzimski preparat iz pivskih kvasaca donjeg vrenja koji je hidrolizovao melibiozu izolovan je pre sto godina i nazvan je melibiaza. Enzim koji hidrolizuje jednostavne α -D-galaktozide, kao i oligosaharide i polisaharide gde se javlja α -D-galaktozilni ostatak na neredukujućem kraju molekula je α -galaktozidaza (α -D-galaktozid galaktohidrolaza, E.C. 3.2.1.22). Ovaj enzim pored hidrolize melibioze na galaktozu i glukozu hidrolizuje rafinozu na galaktozu i saharozu (64). Konstatovano je da ovaj enzim iz kvasaca donjeg vrenja hidrolizuje takođe fenil, m-metilfenil, p-metilfenil i p-nitrofenil α -D-galaktopiranozide i to u približno istom nivou. Pored toga, kao supstrat za α -galaktozidazu javlja se i metil- α -D-galaktopiranozid (7). Uopšteno se može reći da ovaj enzim pokazuje afinitet prema piranoznom prstenu gde je konfiguracija H i OH na ugljenikovim atomima od 1 do 4 identična kao kod galaktoze, a da veza na šestom C-atomu ima manji značaj (65).

Prisustvo ovog enzima otkriveno je kod velikog broja mikroorganizama, biljaka i životinja (64). Njegovo prisustvo kod biljaka objašnjava se potrebom da se rezervni oligogalaktosaharidi iz semena iskoriste kao izvori energije za vreme rane faze klijanja semena (66). Kod mikroorganizama α -galaktozidaza je detektovana kod eubakterija (*Aerobacter aerogenes*, *Clostridium* sp., *Diplococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas saccharophila*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus* sp.), višecelijskih bakterija (*Actinomyces* sp. i *Streptomyces* sp.), plesni (*Agaricus bisporus*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mortierella vinacea*) i nekih kvasaca (65, 66).

Da se α -galaktozidaza javlja u multimolekularnoj formi otkriveno je pre tridesetak godina (67). Kod većeg broja biljaka nađeno je bar dve frakcije veoma različitih molskih masa (66). Kod kvasca *Sacch. carlsbergensis* je utvrđeno da je molska masa 300.000 i da sadrži oko 57% ugljenih hidrata sastavljenih primarno od D-manoze (9). Slično α -galaktozidazi iz biljaka i kod kvasaca (konkretno *Sacch. carlsbergensis*) zapažena je veoma heterogena distribucija molskih masa, tj. multimolekularna forma ovog enzima sa različitom aktivnošću (68). Za α -galaktozidazu kvasaca pri hidrolizi melibioze i rafinoze pH optimum je između 4 i 5 (9), dok se u podacima Dey-a i Pridham-a (65) javljaju dva intervala kao pH optimumi za ovu α -galaktozidazu, i to: 3,5-5,3 (supstrat melibioza) i 3,5-4,5 (razni hromogeni supstrati).

Za α -galaktozidazu iz plesni *Aspergillus niger*, otkriveno je da je glukoprotein kao i većina glukozidaza koje plesni izlučuju u podlogu. Međutim, struktura šećernog dela u ovom enzimu predmet je aktuelnih ispitivanja (69, 70) gde je određena struktura većeg broja oligosaharida koji se dobijaju hidrolizom šećernog dela enzima. Pored toga, kod te α -D-galaktozidaze dva manooligosaharida

imaju β -D-galaktofuranozni ostatak povezan sa manozom na neredukujućem kraju. Autori tog ispitivanja smatraju da istraživanja ovog tipa pružaju i informacije koje treba da doprinesu razjašnjenju mehanizma sinteze i sekrecije enzima glukoproteinske prirode.

Sredinom ovog veka zapaženo je da α -galaktozidaza iz kvasca pokazuje transgalaktozidaznu aktivnost (71). Od tada je ova osobina α -galaktozidaze iz različitih izvora dosta proučavana uzimajući u obzir brojne činioce kao što su: tip donora i tip akceptora, koncentracija akceptora, pH i temperatura (72, 73). Na osnovu podataka koje su izneli istraživači Dey i Pridham (65), data je tabela 2 koja prikazuje α -galaktozidaznu transgalaktozidaznu aktivnost kada je akceptor ili donor melibioza.

Tabela 2. Transgalaktozidazna aktivnost α -galaktozidaze prema Dey-u i Pridham-u (65)

akceptor	donor	produkti	izvor enzima
melibioza	melibioza	<ul style="list-style-type: none"> • dva neredukujuća šećera (jedan je sastavljen od dve D-galaktoze, a drugi od D-galaktoze i D-glukoze) • galaktobioza • galaktotrioza • maninotrioza • verbaskotetraoza 	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
melibioza	melibioza	• maninotrioza	? ^a
N-acetil-D-glukozamin	melibioza	6-O- α -D-galaktozil-N-acetil-D-glukozamin	<i>Saccharomyces</i> sp.

^a nema naveden izvor, a pretpostavljam da je verovatno iz kvasca

U ovim ispitivanjima, kod većine slučajeva, zapaženo je da pri dugotrajnoj inkubaciji reakcione smeše dolazi do smanjenja koncentracije i iščezavanja produkata, tj. do njihove hidrolize. Ova činjenica jasno ukazuje da je u tim produktima bila α -D-galaktozil konfiguracija. Smatra se da je koncentracija transglikolitičkih produkata kinetički kontrolisana i da se ostvaruje visok reakcioni nivo uz dobar prinos (74).

Pored hidrolazne i transgalaktozidazne aktivnosti α -galaktozidaza ispoljava i aktivnost *de novo* sinteze, tj. reversnost hidrolitičke reakcije, kada se inkubira sa visokom koncentracijom monosaharida. Ova reakcija zapažena je početkom ovog veka, ali tek od sredine veka predmet je šireg ispitivanja u cilju dobijanja specifičnih ugljenih hidrata. Da polimerizuje D-galaktozu iz 17,6% rastvora tog šećera pokazala je α -galaktozidaza od pivskih kvasaca. Inkubacija je izvedena na 25°C, pri pH 4,7 u trajanju 2 nedelje. Ostvaren je prinos od 7,5% od čega je oko

60% 6-O- α -D-galaktopiranozil-D-galaktoza, a favorizovanje stvaranja α -1 \rightarrow 6- veza se objašnjava visokom reaktivnošću primarne hidroksilne grupe šećera (74). Pored toga, kao produkti se javljaju α -1 \rightarrow 3-, α -1 \rightarrow 4- i α -1 \rightarrow 5- galaktobioze (75). Mogućnost dobijanja oligosaharida koji se ne sreću u prirodi mehanizmom pomeranja ravnoteže iz hidrolitičke reakcije na suprotnu stranu ima ograničenja koja su i ilustrovana u navedenom primeru, a sastoje se iz: niskog prinosa, dobijanja smeše izomera i dugačko vreme uz veliku koncentraciju šećera (74).

2.4. ZNAČAJ FERMENTACIJE RAFINOZE I MELIBIOZE KVASCIMA

Fermentacija rafinoze i melibioze kvascima kao fiziološka obeležja prevashodno se koriste u identifikaciji kvasaca. Značaj ovih fermentacija nije samo u fundamentalnim oblastima kao što su taksonomija i genetika kvasaca već imaju i konkretnu primenu u biotehnologiji.

Usvajanje rafinoze i melibioze pripada grupi ključnih fizioloških i taksonomskih osobina u ispitivanjima kvasaca. Rezultati ispitivanja ovih i najčešće druga četiri ugljena hidrata, opredeljuju razvrstavanje uglavnom unutar roda, a ponekad i između rodova – primer su vrste roda *Lipomyces* koji su isključivo nefermentativni kvasci (12).

Prema taksonomskim priručnicima „The Yeasts. A taxonomic study“ II (1970) (14) i III izdanja (1984) (1) ističe se da je kod svakog novo izolovanog soja potrebno ispitati sposobnost fermentacije melibioze i rafinoze. Testovi fermentacije su prema aktuelnom referentnom priručniku za taksonomiju kvasaca (iz 1984. god.) izgubili primarni značaj u određivanju fizioloških karakteristika. Ranija znanja o kvascima upućivala su da je (ne)fermentacija stabilna i nepromenljiva osobina, ali je vremenom zapaženo da je fermentacioni model nestabilan verovatno zbog mutacionih promena (9, 76, 77). Razlike u fermentativnim osobinama, koje i sada imaju svoje mesto među taksonomskim kategorijama ali sada ne utiču primarno na razdvajanje u različite vrste, koriste se da istaknu razlike među sojevima, a samo kod rodova *Hansenula*, *Rhodotorula* i *Candida* zajedno sa oko 20 izvora ugljenika primarni su u diferenciranju vrsta. Ilustrativan primer činjenice da je fermentacioni test veoma dobar za diferenciranje ali da gubi jedno od ključnih mesta u taksonomiji su pivski kvasci donjeg vrenja koji su prema I izdanju iz 1952. godine bili razvrstani u dve vrste: *Sacch. uvarum* (ne fermentira maltotriozu) i *Sacch. carlsbergensis* (fermentira je) (78), da bi u narednom izdanju iz 1970. godine oni bili objedinjeni u *Sacch. uvarum* (79) sa ključnom osobinom da fermentiraju melibiozu i rafinozu, a u III izdanju iz 1984. godine su samo sojevi vrste *Sacch. cerevisiae* (80). Međutim, i dalje postoji potreba da se rade fermentativni testovi i za kulture koje su već deponovane, osobito u slučaju kada postoji pozitivna korelacija između fermentativnih svojstava i analize DNA (81). Na osnovu najnovijih istraživanja verovatno je da će se taksonomija sve više oslanjati na druge kriterijume, kao što su



elektroforeza proteina i antigena i tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC) masnih kiselina (82) koji se uz kompjutersku obradu pokazuju kao veoma efikasni (83), a da će neki od aktuelnih kriterijuma (morfološki, odgajivački, fiziološki, ekološki) koristiti samo kod opisa sojeva i vrsta kvasaca.

Razlikovanje da li neki soj fermentira rafinozu i melibiozu ima i praktičan mikrobiološki značaj, jer pored drugih osobina koristi se u diferenciranju pivskih kvasaca gornjeg i donjeg vrenja (57).

Fermentacija melibioze, a time i celog molekula rafinoze, veoma je poželjna osobina za pekarski kvasac koji se gaji u podlozi sa melasom od šećerne repe ili od šećerne trske jer je sadržaj rafinoze u njoj do 3%, tj. obično od 0,5 do 2% (36). Napori istraživača bili su usmereni na prenošenje ove osobine iz pivskih kvasaca donjeg vrenja u pekarski kvasac metodom hibridizacije (15). Međutim, ovako kreirani kvasac je pokazivao poboljšan prinos, što znači da je bolje iskorišćena melasa, ali je imao loše pekarske karakteristike. Zbog činjenice da je sadržaj rafinoze u melasi od šećerne repe čak do 8%, pažnja istraživača je bila i dalje usmerena na ovaj problem. Ugradnja gena koji bi omogućavao da običan pekarski kvasac, koji je fenotipski MeI^- i genetski mel^o , razgrađuje melibiozu urađena je modernim genetskim tehnikama – rekombinatnom DNA tehnologijom, a dobijeni kvasac se uspešno može koristiti u pekarstvu (84). Nadalje, fermentacija melibioze, a time i rafinoze smatra se poželjnom osobinom za proizvodni pivski kvasac dobijen genetskim manipulacijama iz *Saccharomyces diastaticus* i *Sacch. uvarum* u cilju iskorišćenja dekstrina iz slada (31, 85).

Značaj fermentativnog procesa razgradnje melibioze sadržan je i u činjenici da su geni odgovorni za njenu fermentaciju među prvima proučavani (86). Međutim, genetski aspekti tog procesa kod kvasaca nisu potpuno razjašnjeni i proučeni (62), a smatra se da je genetska osnova fermentacije melibioze veoma pogodan kriterijum za istraživanja sličnosti i razlika među vrstama i rodovima kvasaca (58, 61). Za fermentaciju melibioze odgovorni geni su od interesa u ispitivanjima evolucije kvasaca (87). Kvasci sa svojstvom intenzivne fermentacije melibioze danas su interesantni za dobijanje α -galaktozidaze čijim delovanjem dolazi do konverzije crvenih krvnih zrnaca grupe B u grupu 0, a da se ne narušava celovitost, životnost i imunološka tolerancija eritrocita (88).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MIKROORGANIZMI

U radu su korišćeni kvasci iz zbirke kultura predmeta Mikrobiologija Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Osnovni podaci o izolatima kvasaca dati su u tabeli 3.

Tabela 3. Osnovni podaci o korišćenim izolatima kvasaca

red. broj	šifra izolata	vrsta ili proizvodna osobina	poreklo i izvor	vreme unosa u zbirku
1.	135	<i>Sacch. uvarum</i> (<i>carlsbergensis</i>)	Tehnološki fakultet Zagreb (dr D.Salopek)	1961.
2.	539	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Prag	31.10.1963.
3.	OKII8	<i>Sacch. cerevisiae</i> (top yeast)	Poljoprivredni fakultet Zemun (dr B. Stević)	1966.
4.	SAAZ	<i>Sacch. cerevisiae</i> (top yeast)	Poljoprivredni fakultet Zemun (dr B. Stević)	1966.
5.	253	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	Tehnološki fakultet Zagreb	1962.
6.	4837	<i>Sacch. uvarum</i> (<i>carlsbergensis</i>)	od dr I. Kalačević (izvor nepoznat)	1967.
7.	111	<i>Sacch. uvarum</i> (<i>carlsbergensis</i>)	Hefebank Weihenstephan	1967.
8.	112	<i>Sacch. uvarum</i> (<i>carlsbergensis</i>)	Hefebank Weihenstephan	1967.
9.	SM	<i>Sacch. uvarum</i> (<i>carlsbergensis</i>)	domaća pivara (izvor nepoznat)	1971.

Tabela 3. (nastavak)

red. broj	šifra izolata	vrsta ili proizvodna osobina	poreklo i izvor	vreme unosa u zbirku
10.	B194-HeBru	pivski kvasac	pivara Valjevo	22.9.1980.
11.	A 34-Rz70Nüh	pivski kvasac	pivara Valjevo	22.9.1980.
12.	OZG1	pivski kvasac	pivovara Zagreb (od pivovare Osijek)	1981.
13.	OČ1	pivski kvasac	pivara Čelarevo (od pivovare Osijek)	1981.
14.	ČA	pivski kvasac	pivara Čelarevo	mart 1987.
15.	Č34	pivski kvasac	pivara Čelarevo	mart 1987.
16.	P2-3	pivski kvasac	pivara Zrenjanin	04.03. 1987.
17.	B-2	pivski kvasac	pivara Bečej	mart 1987.
18.	CO4	pivski kvasac	pivara Zrenjanin	04.03. 1987.
19.	1026/II	<i>Sacch. cerevisiae</i> (top yeast)	Poljoprivredni fakultet Zemun (dr I. Čukalović)	13.2.1991.
20.	1245/II	<i>Sacch. cerevisiae</i> (top yeast)	Poljoprivredni fakultet Zemun (dr. I. Čukalović)	13.2.1991.
21.	BS1	pivski kvasac	Poljoprivredni fakultet Zemun (dr B. Stević)	1966.
22.	Sm	pivski kvasac	pivara Pančevo (iz CHI SAS – ČSSR)	18.3.1992.
23.	VUPS	pivski kvasac	pivara Pančevo	18.3.1992.
24.	A	pivski kvasac	pivara Valjevo	24.7.1995.
25.	367	<i>Sacch. pastorianus</i>	Prag	31.10.1963.
26.	S.bay.	<i>Sacch. bayanus</i>	nepoznati	1972.
27.	359	<i>Sacch. bayanus</i>	Prag	31.10.1963.
28.	Sd	<i>Sacch. diastaticus</i>	Preh.-bioteh. fakul. Zagreb (od dr R.Razmovski)	17.09.1992.
29.	OKVI4	<i>Sacch. heterogenicus</i>	Poljoprivredni fakultet Zemun (dr B. Stević)	1966.
30.	S400	<i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> , vinski	od dr D.Milisavljević (izvor nepoznat)	1963.
31.	Mo	<i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> , vinski	od dr D.Milisavljević (izvor nepoznat)	1968.

Tabela 3. (nastavak)

red. broj	šifra izolata	vrsta ili proizvodna osobina	poreklo i izvor	vreme uno- sa u zbirku
32.	Ay	vinski kvasac	od dr D.Milisavljević (iz Francuske)	1968.
33.	S-3	<i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> vinski	od dr D.Milisavljević (izvor nepoznat)	1968.
34.	S-1	vinski kvasac	od dr D.Milisavljević (izvor nepoznat)	1968.
35.	V-6	<i>Sacch. oviformis</i>	od dr D.Milisavljević (Smederevo-rizling)	juni 1969.
36.	Epernay	<i>Sacch. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> vinski	od dr D.Milisavljević (izvor nepoznat)	1968.
37.	Tokajer	vinski kvasac	od dr D.Milisavljević (izvor nepoznat)	1968.
38.	<i>cerevisiae</i>	vinski kvasac	od dr D.Milisavljević (izvor nepoznat)	1968.
39.	DTN	<i>Sacch. cerevisiae</i>	pogon pekarskog kvasca Beograd	1966.
40.	163	<i>Sacch. cerevisiae</i>	Pasterov institut Pariz	1963.
41.	Suvi6	<i>Sacch. cerevisiae</i>	reizolat iz suvog kvasca nepoznatog proizvođača	decembar 1977.
42.	18	<i>Schiz. pombe</i>	Tehnološki fakultet Zagreb	1961.
43.	2	<i>Saccharomycodes</i> sp.	nepoznati	21.06.1975.
44.	top3	<i>Kluyveromyces</i> <i>marxianus</i>	I.N.R.A. Narboune, France (doneo dr V.Kovač)	17.06.1981.
45.	top9	<i>K. marxianus</i> 12108 GPC	Kanada (doneo dr S.Gaćeša)	septembar 1982.
46.	D ₂ B/2	<i>Debaryomyces</i> sp.	gomolje dalije	1982.
47.	C ₃₆	<i>Torula</i> sp.	Pasterov institut Pariz	1961.

3.2. PODLOGE

Za ispitivanje fermentativnih svojstava kvasaca prema rafinozi, melibiozi i drugim šećerima (glukoza, fruktoza, galaktoza saharoza, laktoza) korišćene su podloge sledećeg sastava: 2% melibioze ili odgovarajućeg šećera (jedino kod rafinoze 4%) i 0,5% kvašćevog ekstrakta (Difco, Detroit).

Za ispitivanje asimilacije korišćena je čvrsta kosa podloga sledećeg sastava: 0,1% melibioze (tj. 0,2% rafinoze) i 0,67% Bacto Yeast Nitrogen Base (u daljem tekstu YNB, Difco, Detroit) sa 2% agara (Noble agar, Difco, Detroit).

Postupak pripreme obe podloge bio je izveden u skladu sa procedurom u standardizovanom testu (11, 12).

Za pripremu inokuluma korišćen je YM agar (Difco, Detroit) (89) propisan testom. Pored toga, kada je fermentacija melibioze bila negativna za pripremu novog inokuluma korišćena je galaktoza – kvašćev ekstrakt agarizovana podloga (u daljem tekstu podloga YGal) sledećeg sastava: 1% galaktoze, 0,5% kvašćevog ekstrakta i 2% agara (Noble agar, Difco, Detroit). Nakon razlivanja podloga je sterilisana na 118°C u trajanju od 20 minuta.

Za ispitivanje biotehnoloških aspekata nastajanja intermedijera korišćene su podloge sledećeg sastava:

a) 2% melibioze (tj. 4% rafinoze) + 0,4% kvašćevog ekstrakta

b) 2% melibioze (tj. 4% rafinoze) + 0,67% YNB (u daljem tekstu podloga YNBMel ili YNBRAF).

Postupak pripreme ovih podloga bio je identičan onom koji je primenjen za ispitivanje fermentativnih svojstava kvasaca.

U pojedinim ogledima kod primene podloge (a) variran je sadržaj izvora ugljenika ili azota što je posebno naglašeno prilikom pretstavljanja rezultata.

U ovoj fazi rada za pripremu inokuluma korišćena je ista podloga kao kod ispitivanja fermentativnih svojstava, tj. YGal podloga, kao i podloge sa 1% melibioze odnosno 2% rafinoze kao jedinog izvora ugljenika. Pored toga, inokulum je pripreman na podlozi YM agar (Difco, Detroit), novi sladni agar (11) i podlozi sledećeg sastava: 1% galaktoze (tj. 2% rafinoze) i 0,67% YNB i 2% agara. Nakon razlivanja, pripremljene podloge su sterilisane na 118°C u trajanju od 20 minuta. Procedura zasejavanja takođe je podržavala standardizovanu proceduru, ako nije kod rezultata posebno naglašen postupak pripreme inokuluma.

U ogledima za određivanje sadržaja intermedijera u fermentisanoj podlozi, kao i za dobijanje veće količine fermentisane podloge u cilju izolovanja i prečišćavanja intermedijera korišćena je podloga YNBMel i YNBRAF, a za pripremu inokuluma korišćena je kosa podloga sastava: 2% galaktoze, 0,67% YNB i 2% agara.

3.3. FERMENTACIJA RAFINOZE, MELIBIOZE I DRUGIH UGLJENIH HIDRATA I AEROBNO USVAJANJE RAFINOZE I MELIBIOZE

Kod testiranja usvajanja rafinoze i melibioze izolatima kvasaca na opisanim podlogama zasejavanje je rađeno prema proceduri u standardizovanom testu (11, 12). Epruvete i petrijevke su inkubirane na 26°C u periodu do kraja fermentacije ili do 21 dan.

Kriterijum o pozitivnoj (+) ili negativnoj (-) asimilaciji bio je rast izolata iz 2 nezavisna (vremenski razdvojena) ponavljanja.

Kriterijum o pozitivnoj (+) ili negativnoj (-) fermentaciji je pojava gasa u durhamovoj epruveti iz najmanje 2 nezavisna (vremenski razdvojena) ponavljanja.

3.3.1. Određivanje preostalih ugljenih hidrata standardizovanim metodama u fiziološkom testu fermentacije rafinoze i melibioze

Provera da li su tokom testiranja konstituenti melibioze i rafinoze fermentovani ili ne, tj. detektovanje preostalih šećera u fermentisanoj podlozi rađeno je mikrobiološkom i hemijskom metodom. U mikrobiološkoj metodi korišćen je soj 112, tj. *Sacch. carlsbergensis* iz Hefebank u Weihestephan-u, prema propisanoj proceduri (11). U opsežnim ispitivanjima kvasaca iz ove kolekcije proizvodnih kultura, koja je ranga nacionalne kolekcije, konstatovano je da *Sacch. carlsbergensis* soj 112 nema izmenjene fiziološke i proizvodne osobine u odnosu na nulta ispitivanja urađena pri izolovanju tog kvasca iz proizvodnje (90, 91). U hemijskoj metodi rezidualnih šećera korišćen je Luff-ov reagens i glukoza-oksidadza indikator papir prema propisanoj proceduri (11).

3.3.2. Određivanje preostalih ugljenih hidrata hromatografskom metodom u fiziološkom testu fermentacije rafinoze i melibioze

Za detektovanje preostalih šećera u fermentisanoj podlozi i za praćenje procesa fermentacije melibioze i rafinoze, kao i drugih šećera primenjena je hromatografija na tankom sloju silikagela G po Stahl-u (Merck, Darmstadt ili Kemika, Zagreb). Tanki slojevi silikagela, debljine 0,25 mm (ploče 20×20 cm) pripremljeni su pomoću aparata DESAGA-DC. U određenim vremenskim intervalima (svaka 24h) od zasejavanja, pod sterilnim uslovima nakon blagog homogenizovanja podloge uzimano je po 0,1 ml podloge pa je odatle 25 μ l nanošeno u obliku mrlje na hromatografske ploče.

Kod većine ogleda je fermentacija praćena i tankoslojnom hromatografijom visokog učinka, tj. na HPTLC pločama sa silikagelom 60 i koncentracionom zonom (Merck, Darmstadt) nanošenjem 5 μ l podloge na hromatografske ploče.

Za razvijanje TLC i HPTLC ploča korišćena je pokretna faza sastava: hloroform : glacijalna sirćetna kiselina : voda = 3 : 6 : 1 (v/v/v) ili pokretna faza sastava: metilen hlorid : glacijalna sirćetna kiselina : voda = 3,5 : 5,5 : 1 (v/v/v). Hromatogrami su razvijani uzlaznom jednodimenzionalnom tehnikom na sobnoj temperaturi, u hromatografskim komorama zasićenim parama rastvarača, do visine fronta pokretne faze od oko 19 cm (tj. za HPTLC ploče od oko 9,8 cm). Razvijen hromatogram je sušen 20 minuta na 55–60°C. Potom je ovaj hromatogram ponovo razvijan u sveže pripremljenoj pokretnoj fazi istog sastava na identičan način. Nakon sušenja, izazivanje hromatograma je rađeno prskanjem 50% (m/m) sumpornom kiselinom u etanolu i grejanjem 20 minuta na 110°C.

Na osnovu R_f vrednosti čistih šećera detektovane su mrlje, tj. jedinjenja u fermentacionoj podlozi. Rastvori čistih šećera su pripremljeni u vidu pojedinačnih rastvora koncentracije 1 mg/ml i smeše šećera iste koncentracije, a na ploče je nanošena ista zapremina kao za uzorke. U radu su korišćeni sledeći čisti šećeri: glukoza, galaktoza, fruktoza, saharoza, melibioza, laktoza i rafinoza. Navedeni šećeri i sve druge upotrebljene hemikalije u ovom radu su p.a. stepena čistoće, ukoliko nije drugačije naglašeno.

3.4. ANALIZA FERMENTACIONIH UZORAKA HPLC METODOM

Za kvantitativno određivanje ispitivanog intermedijera tokom fermentacije uzorci su pripremani na način opisan u narednom poglavlju. Sadržaj galaktoze, melibioze i ispitivanog intermedijera u podlozi iz različitih vremena fermentacije rafinoze i melibioze određen je tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom metodom spoljašnjeg standarda. Korišćen je aparat HP 1090M sa kolonom AMINEX HPX-87C (300×7,8 mm) i refraktivnim detektorom (RI HP 1037A Refractive index detector with DAC converter). Pokretna faza bila je degazirana voda sa brzinom protoka 0,6 ml/min, a radna temperatura 85°C.

3.5. METODE IZOLOVANJA I PREČIŠĆAVANJA ISPITIVANOG INTERMEIDIJERA

3.5.1. Obrada fermentacionog uzorka

Za semipreparativno izdvajanje tankoslojnom hromatografijom i kolonskom hromatografijom fermentacioni uzorak je pripremljen na sledeći način:

Nakon određenog vremena gajenja fermentaciona masa je ohlađena i odvojene su kvasne ćelije centrifugiranjem na 5000 o/min za 10 minuta. Supernatant je dekantiran, a ćelije su isprane 2 puta sa malo sterilne destilovane vode. Spojeni supernatanti su profiltrirani kroz filter pora 0,45 μm (Milex-HV, Millipore, Bedford). Filtrat je koncentrovan do suva, osušen u vakuum sušnici (24 sata na 45°C) i izmeren.

Priprema uzorka za kvantitativno određivanje jedinjenja (galaktoze, melibioze i ispitivanog intermedijera) u podlozi urađena je na identičan način kao prethodno opisana priprema uz dodatnu obradu. Nakon sušenja i merenja uzorak je rastvoren u destilovanoj vodi do početne zapremine fermentacione podloge. Rastvor je propušan kroz kolonu sa jako kiselom – katjonskom smolom (Kemika, Zagreb) i kroz kolonu sa slabo baznom – anjonskom smolom (Kemika, Zagreb). Za eluiranje uzorka kroz obe kolone korišćena je destilovana voda. Dejonizovani rastvor je koncentrovan do suva i dodatno sušen u vakuum

sušnici 24 sata na 45°C. Izmerena masa je korišćena za kvantitativno određivanje nekih jedinjenja u podlozi HPLC metodom.

3.5.2. Semipreparativna tankoslojna hromatografija

Za semipreparativno izdvajanje ispitivanog jedinjenja koje se javlja tokom fermentacije melibioze i rafinoze u podlozi primenjena je hromatografija na tankom sloju silikagela G po Stahl-u (Merck, Darmstadt ili Kemika, Zagreb) debljine 0,5 mm (ploče 20×20 cm). Mikropipetom je na ploče nanošen rastvor u količini koja odgovara 75–100 mg suve materije fermentacione podloge u obliku trake. Postupak razvijanja hromatografskih ploča je identičan sa prethodno opisanim postupkom uz korišćenje pokretne faze metilen hlorid : glacijalna sirćetna kiselina : voda = 3,5 : 5,5 : 1 (v/v/v). Nakon sušenja ploča posle drugog razvijanja, zone na krajevima ploča su isprskane 50% rastvorom (m/m) sumporne kiseline u etanolu. Ostali deo ploče je zaštićen metalnom pločom da ne bi došlo do njenog izazivanja. Posle izazivanja krajnjih zona hromatograma, zagrevanjem na 110°C za 20 minuta, neposredno iznad i ispod mrlje ispitivanog jedinjenja skalpelom su povučene linije paralelne sa startnom trakom. Sa ovog polja na neizazvanom delu hromatograma, špatulom je sastrugan silikagel. Iz tog sastruganog silikagela ispitivano jedinjenje je ekstrahovano 3 puta sa po 5 ml metanola mućkanjem u vremenu od po 120 minuta. Nakon filtriranja ekstrakta preko G4 filtra uklonjen je rastvarač. Suvi ostatak je osušen u vakuum sušnici 24 sata na 45°C i izmeren. Na osnovu dobijene mase i zapremine podloge za fermentaciju izračunat je prinos jedinjenja po jedinici mase korišćenog šećera (rafinoze i melibioze).

3.5.3. Kolonska „flash“ hromatografija

U staklenu kolonu (ϕ 25 mm; h=410 mm) unet je silikagel za „flash“ hromatografiju (Fluka, Buchs) (25 g). Zatim je kroz kolonu propuštena pokretna faza sastava metilen hlorid : glacijalna sirćetna kiselina : voda = 3,5 : 5,5 : 1 (500 ml) i na ovaj način pripremljena kolona sa silikagelom (visina stuba 140 mm). Obradeni fermentacioni uzorak (300 mg) je unet u kolonu nakon suspendovanja u pokretnoj fazi (1,5 ml) istog sastava kao za pripremu kolone. Za razdvajanje korišćena je ista pokretna faza tako da se kontinualno ispušta iz kolone, pod stalnim pritiskom, sa brzinom eluiranja 3 ml/min. Izdvajane su frakcije zapremine 6,5 ml. Hromatografijom na tankom sloju silikagela ispitivan je kvalitativni sastav svih frakcija postupkom opisanim u poglavlju 3.3.2. Frakcije istog sastava su spojene, a pokretna faza uklonjena na rotacionom vakuum uparivaču pod smanjenim pritiskom (temperatura kupatila 45 C). Suvi ostatak je sušen u vakuum sušnici i potom meren.

3.5.4. Kolonska hromatografija sa silikagelom G

U staklenu kolonu (ϕ 70 mm; h=120 cm) unet je silikagel G (Kemika, Zagreb) (100 g) suspendovan u pokretnoj fazi (400 ml) metilen hlorid : glacijalna sirćetna kiselina : metanol (3 : 4 : 3, v/v/v). Posle stajanja preko noći ispuštena je pokretna faza i na ovaj način pripremljena je kolona sa visinom stuba 23 cm. Obradeni fermentacioni uzorak (900 mg) je unet u kolonu nakon suspendovanja u pokretnoj fazi (10 ml) istog sastava kao za pripremu kolone. Za razdvajanje korišćena je ista pokretna faza tako da se kontinualno ispušta iz kolone brzinom eluiranja 0,3 ml/min. Izdvajane su frakcije zapremine 6,5 ml. Hromatografijom na tankom sloju silikagela ispitivan je kvalitativni sastav svih frakcija postupkom opisanim u poglavlju 3.3.2. Frakcije istog sastava su spojene, a pokretna faza uklonjena na rotacionom vakuum uparivaču pod smanjenim pritiskom (temperatura kupatila 45 C). Suvi ostatak je sušen u vakuum sušnici i potom meren.

3.5.5. Acetilovanje uzorka

Uzorak (100 mg) ispitivanog jedinjenja, prečišćavan na koloni silikagela za „flash“ hromatografiju, prenet je u balon sa šlifom u koji je potom dodat apsolutni piridin (5 ml) i anhidrid sirćetne kiseline (1,5 ml). Reakciona smeša je ostavljena da stoji na sobnoj temperaturi 24 sata. Zatim je sadržaj balona unet u levak za odvajanje u kom se nalazi led i razblažena HCl (HCl : voda = 1 : 5) (15 ml). Acetilovani proizvodi je ekstrahovan hloroformom (3 puta 10 ml). Spojeni ekstrakti su isprani 4 puta vodom (po 8 ml) radi odstranjivanja kiseline. Posle sušenja bezvodnim natrijum-sulfatom i otparavanja rastvarača dobijen je sirovi acetilovani proizvod je potupno osušen u vakuum sušnici za 72 sata na 45°C i izmeren je prinos acetilovanja.

3.5.6. Izdvajanje acetilovanog oblika ispitivanog intermedijera kolonskom hromatografijom

U staklenu kolonu (ϕ 25 mm; h = 410 mm) unet je silikagel G (Kemika, Zagreb) (30 g) suspendovan u pokretnoj fazi (150 ml) etilacetat : toluol (5 : 5; v/v). Nakon stajanja preko noći ispuštena je pokretna faza i na ovaj način pripremljena je kolona sa visinom stuba 21 cm. Obradeni fermentacioni uzorak (250 mg) rastvoren je u pokretnoj fazi (1,2 ml) istog sastava kao za pripremu kolone. Za razdvajanje korišćena je takođe ista pokretna faza tako da se kontinualno ispušta iz kolone brzinom eluiranja 0,7 ml/min. Izdvajane su frakcije zapremine 2,5 ml. Hromatografijom na tankom sloju silikagela ispitivan je kvalitativni sastav svih frakcija primenom sistema rastvarača etilacetat : toluol (5,5 : 4,5, v/v) kao pokretne faze. Frakcije istog sastava su spojene, a pokretna faza uklonjena na rotacionom vakuum uparivaču pod smanjenim pritiskom (temperatura kupatila 45 C). Suvi ostatak je sušen u vakuum sušnici i potom meren.

3.5.7. Dezacetilovanje

Dezacetilovanje ispitivanog acetilovanog intermedijera rađeno je primenom postupka metanolize, koja se izvodi na sledeći način:

Acetilovani uzorak (100 mg) sa kolone je rastvoren u apsolutnom metanolu (5 ml), uz dodatak rastvora natrijummetilata koncentracije 1 mol/dm^3 (50 μl). Nakon 15 minuta stajanja na sobnoj temperaturi iz reakcione smeše je uzet uzorak (5 μl) i nanet na hromatogramsku ploču silikagela G debljine 0,25 mm (ploča 2,5 \times 7,5 cm). Hromatogram je razvijan primenom pokretne faze etil-acetat : toluol (5 : 5, v/v) i izazvan 50% (m/m) rastvorom sumporne kiseline u etanolu uz grejanje na 110°C za 20 minuta. Pošto na hromatogramu nije bilo drugih mrlja osim startne, reakcija dezacetilovanja je završena pa je rastvor neutralisan (do pH 5–6) glacijalnom sirćetnom kiselinom (1 kap) i rastvarač otparen do suva pod smanjenim pritiskom. Suvi ostatak je, radi istiskivanja sirćetne kiseline, tretiran toluolom (5 ml) 3 puta, a on je uklanjan isparavanjem pod smanjenim pritiskom. Suvi ostatak je dodatno sušen u vakuum sušnici 48 sati na 45°C i potom izmeren radi izračunavanja prinosa intermedijera u odnosu na startnu količinu rafinoze ili melibioze.

3.6. ODREĐIVANJE STRUKTURE ISPITIVANOG INTERMEĐIJERA

Kvalitativni pokazatelji i orijentacioni podaci o ispitivanom intermedijeru dobijeni su metodom hromatografije na tankom sloju silikagela G (Kemika, Zagreb) primenom postupka opisanog u poglavlju 3.3.2., stim da je izazivanje hromatograma rađeno različitim reagensima.

Kvalitativna dokazna reakcija na redukujuće šećere urađena je prema standardizovanoj proceduri opisanoj kod određivanja redukujućih šećera u podlozi nakon fermentacije (11).

IR spektri su snimljeni na Infrared-Spectrophotometr-u UNICAM SP 1100, a položaj traka (ν_{max}) dat je cm^{-1} .

Hidroliza ispitivanog intermedijera izvedena je prema postupku opisanoj kod ispitivanja sastava galaktobioza nastalih enzimskom polimerizacijom od D-galaktoze pomoću α -galaktozidaze (75). Za pripremu kvasca korišćen je *Sacch. carlsbergensis* soj 112 gajen 38 sati u podlozi sa fermentaciju rafinoze. Od fermentacione mase kvasne ćelije su odvojene centrifugiranjem na 5000 o/min za 10 minuta. Ćelije su 2 puta ispirane sa vodom i 2 puta sa hladnim acetonom, a potom sušene u vakuum sušnici 2 dana na temperaturi 45°C. Enzimska hidroliza izvedena je na sledeći način: uzorak ispitivanog intermedijera (5 mg) rastvoren je u vodi (5 ml) i dodat je osušeni kvasac (50 mg). Reakciona smeša je inkubirana pod toluolom 24 sata na temperaturi 30°C. Nakon uklanjanja toluola, kao i ćelija kvasaca centrifugiranjem supernatant je koncentrovan do 1/10 polazne zapremine. Kvalitativni sastav hidrolizata ispitan je metodom hromatografije na tankom sloju silikagela G primenom postupka opisanog u poglavlju 3.3.2. Dokazne reakcije na prisustvo galaktoze i glukoze u hidrolizatu izvedene su primenom enzimskih testova (Boehringer, Mannheim; kataloški broj 176 303, odnosno kat. br. 139 106) prema uputstvu proizvođača.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru ovog rada, ispitivanja nastajanja intermedijera u fermentaciji rafinoze i melibioze kvascima odnosila su se na različite aspekte tog procesa. Radi lakšeg razmatranja rezultata, ovo poglavlje je podjeljeno u pet delova: Preliminarna ispitivanja; Mikrobiološki aspekti; Neki aspekti procesa fermentacije rafinoze i melibioze; Izolacija i prečišćavanje ispitivanog intermedijera; i Određivanje strukture intermedijera.

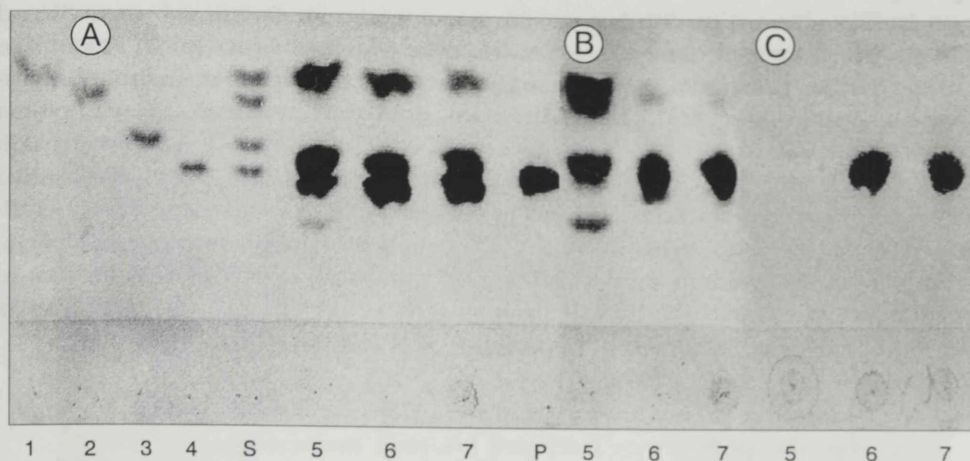
U prikazu rezultata, za izolate kvasaca, korišćeni su podaci o vrsti ili proizvodnom svojstvu koji je dat u opisu zbirke kultura. Determinacija je urađena pri unošenju u zbirku ili preuzeta od izvora odakle kultura kvasca potiče. Prema aktuelnom taksonomskom priručniku (1) velik broj korišćenih izolata pripada vrsti *Saccharomyces cerevisiae* (80).

4.1. PRELIMINARNA ISPITIVANJA

4.1.1. Analiza podloga u fiziološkom testu fermentacije rafinoze dugo čuvanim pivskim kvascima hromatografskom metodom

Fermentacija rafinoze je ključni fiziološki test u razdvajanju pivskih kvasaca donjeg vrenja (lager) od kvasaca gornjeg vrenja (ale) (11, 78, 57, 86). Primenom standardizovanog testa fermentacije rafinoze mora se posle završene fermentacije ispitati sadržaj šećera u podlozi. Njihovo prisustvo se kvalitativno određuje primenom opisanih hemijskih ili mikrobioloških metoda ili njihovom kombinacijom (11, 12). Početna ispitivanja bila su usmerena ka utvrđivanju mogućnosti primene metode tankoslojne hromatografije visokog učinka (HPTLC) u biohemijskoj klasifikaciji kvasaca, odnosno mogućnosti određivanja preostalih šećera prilikom fermentacije rafinoze. U brzom određivanju razgradnih produkata skroba delovanjem mikroorganizama HPTLC metodom, zaključeno je da je ova metoda jednostavna, brza i dovoljna je, bez posebne pripreme, mala količina (do 0,1 ml) uzorka (92). U ispitivanju fermentacije rafinoze korišćena su 3 izolata (539, 135 i 112) pivskih kvasaca donjeg vrenja. Tokom fermentacije

(24 i 48 časova inkubacije), kao i na njenom kraju, praćen je ugljenohidratni sastav podloge navedenom hromatografskom metodom, što je predstavljeno slikom 8.



1 – galaktoza; 2 – saharoza; 3 – melibioza; 4 – rafinoza; S – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza, rafinoza); 5 – izolat 112; 6 – izolat 539; 7 – izolat 135; P – nezasejana podloga

Slika 8. Hromatogrami fermentisanih podloga posle 24 (A), 48 (B) i 96 (C) sati od zasejavanja

Tabela 4. R_f vrednosti ugljenih hidrata u pokretnoj fazi
hloroform : glacijalna sirćetna kiselina : voda = 3 : 6 : 1

ugljeni hidrat	$R_f \times 100$	
	iz pojedinačnih rastvora	iz smeše
galaktoza	71	73
saharoza	67	67
melibioza	58	58
rafinoza	52	52

Na osnovu R_f vrednosti šećera i njihove smeše, što je predstavljeno tabelom 4 utvrđeno je njihovo dobro hromatografsko razdvajanje i detektovanje. Na primeru testiranih pivskih kvasaca pokazano je da se uspešno može analizirati fermentisana podloga, tj. da se mogu na ovaj način određivati rezidualni šećeri u podlozi. Pored toga, zapaženo je da se hromatografskim praćenjem fiziološkog testa fermentacije trisaharida rafinoze mogu detektovati u podlozi pojedini njeni konstituenti nastali delovanjem hidrolitičkih enzima. Međutim, pored šećera koji

sačinjavaju molekul rafinoze na hromatogramima je zapažena još jedna mrlja sa srednjom R_f vrednošću 42 (19). Treba napomenuti da se dobijeni rezultati nisu mogli porediti sa podacima iz literature naprosto zato što takvi podaci ne postoje.

Ispitivani izolati pivskih kvasaca čuvaju se u laboratorijskim uslovima više od 30 godina pa su sagledane njihove morfološke (dužina i širina ćelija) i fiziološke karakteristike (dinamika usvajanja ugljenih hidrata i azota) u simuliranim uslovima proizvodnje (93). Upoređivanjem dobijenih rezultata sa rezultatima određivanja karakteristika nekih proizvodnih sojeva kvasaca iz vojvođanskih pivara (94) zapaženo je da među kvascima nema izrazitih ralika. Na osnovu ispitivanih parametara konstatovano je da nema takvih razlika koji bi upućivali na mogućnost da je višegodišnjim čuvanjem došlo do promena morfoloških, fizioloških i proizvodnih karakteristika. Kod ispitivanih izolata pivskih kvasaca ni zastupljenost respiratorno deficijentnih mutanata (RD mutanti) nije tog nivoa da bi upućivala na pojavu značajnije promene kod kvasaca (95).

4.1.2. Fermentacija melibioze i rafinoze pivskim kvascima iz vojvođanskih pivara i analiza podloge hromatografskom metodom

Ispitivanje fermentacije rafinoze i melibioze sa 6 reizolata pivskih kvasca iz proizvodnje preduzeto je sa ciljem da se uradi retestiranje fiziološkog svojstva fermentacije melibioze i rafinoze. Pri tome je praćen tok i kraj fermentacije primenom tankoslojne hromatografije visokog učinka (HPTLC) sa pokretnom fazom sledećeg sastava: metilenhlorid – glacijalna sirćetna kiselina – voda (3,5 : 5,5 : 1, v/v/v) (96). Hromatogrami fermentacionih podloga posle 3 i 5 dana inkubiranja predstavljeni su na slici 9. Kod svih 6 reizolata fermentacija melibioze i rafinoze je pozitivna. Rezultati određivanja preostalih šećera mikrobiološkom metodom pokazuju da ih nema u podlozi, što bi se i očekivalo uzimajući u obzir poznatu činjenicu da se kod nas pivo dobija sa pivskim kvascima donjeg vrenja. Zapaža se sa slike 9 da je kod svih izolata izgled hromatogramskih traka isti i da se fermentacija rafinoze odvija brže nego fermentacija melibioze kod svih izolata. Pošto se na hromatografskim trakama ne zapaža mrlja saharoze, to ukazuje da, kod fermentacije rafinoze, aktivnost hidrolitičkih enzima koji razgrađuju njen molekul nije ista. Kod svih izolata u hromatografskim trakama fermentacionih podloga sa rafinozom nakon 3 dana inkubiranja zapažena je neidentifikovana mrlja čija je R_f vrednost (0,44) manja od R_f vrednosti rafinoze (0,51) i ista mrlja je zapažena posle 5 dana od zasejavanja u testu fermentacije melibioze, što se vidi na slici 9. Treba napomenuti da su R_f vrednosti svih konstituenata rafinoze manje od R_f vrednosti rafinoze. U standardizovanom fiziološkom testu fermentacije šećera uzima se da je reakcija završena kada u poslednja 24 sata nema više izdvajanja gasa. Za ispitivane izolate u fermentaciji rafinoze to je konstatovano posle 6 dana od zasejavanja. Na hromatografskim trakama fermentacionih podloga sa rafinozom posle 6 dana inkubiranja zapaža se da u podlozi nema rafinoze i monosaharida,

a da je koncentracija melibioze veoma niska. Iako korišćena HPTLC metoda nije kvantifikovana, na osnovu primenjenog postupka prema intenzitetu mrlja, mogu da se izvedu određena zapažanja. To je urađeno za sadržaj melibioze u fermentisanim podlogama u odnosu na smešu čistih šećera čija je koncentracija pojedinačno 1 mg/ml. Na navedenim trakama nema više neidentifikovanog jedinjenja što ukazuje da je to pre neko intermedijerno jedinjenje u ovom testu nego krajnji nuzprodukt fermentacije.



S – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza i rafinoza);

a, b, c, d, e, f – podloga sa melibiozom; A, B, C, D, E, F – podloga sa rafinozom;

a, A – izolat SM; b, B – izolat B-2; c, C – izolat CO4; d, D – izolat P2-3; e, E – izolat Č34;

f, F – izolat ČA

Slika 9. Hromatogrami fermentisanih podloga posle 72 (A) i 120 (B) sati od zasejavanja

4.1.3. Testiranje fermentacionih svojstava kvasaca prema konstituentima rafinoze

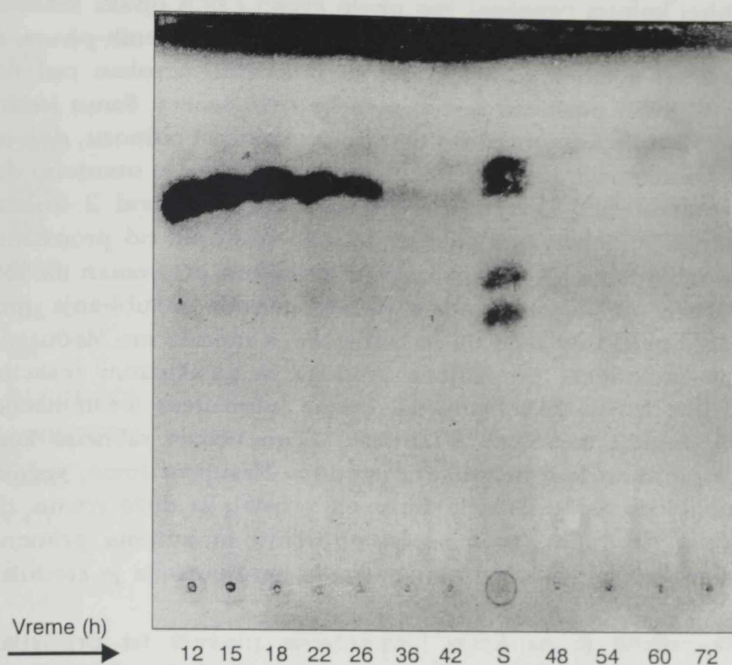
Sa 3 izolata pivskih kvasaca (112, Č34 i OKII8) izvedeni su standardizovani testovi fermentacije nekih mono- i disaharida. Kao izvori ugljenika korišćeni su oni šećeri koji kao osnovne jedinice sačinjavaju molekul melibioze, odnosno rafinoze. Na osnovu dva zakona vrenja, postavljenih od strane Kluyver-a i Stelling-Dekker-a, može se učiniti da je nepotrebno nagomilavanje ispitivanje fermentacije glukoze i fruktoze. Ovde su ti testovi urađeni da se sagleda koje se supstance javljaju u njihovim fermentacionim podlogama. Pored toga, kao izvor ugljenika upotrebljena je laktoza koja je sastavljena kao i melibioza od galaktoze i glukoze, ali za razliku od melibioze gde je tip galaktozidne veze α - kod laktoze je β -tip.

Tabela 5. Fermentacija šećera sa tri izolata pivskih kvasaca

šećer	112				Č34				OKII8			
	v r e m e (h)											
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
glukoza	+	+/-	-	-	+	+/-	-	-	+	+/-	-	-
fruktoza	+	+	-	-	+	+/-	-	-	+	+/-	-	-
galaktoza	+	+/-	-	-	+	+	+	-	+	+	+/-	-
saharoza	+	+/-	-	-	+	+/-	-	-	+	+/-	-	-
laktoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Negativan test fermentacije laktoze kod ovih kvasaca, što se vidi iz tabele 5, bio je očekivan rezultat jer je nemogućnost usvajanja laktoze oksidativno i fermentativno jedna od fizioloških osobina ovih kvasaca (80). Drugačiji rezultati bi ukazivali da bi trebalo preispitati taksonomski status ovih kvasaca. Fiziološko svojstvo fermentacije navedenim šećerima nije praćeno samo izdvajanjem gasa već je hromatografskom metodom praćen sastav jedinjenja u podlozi. U hromatografskim trakama fermentacionih podloga sa glukozom, fruktozom i saharozom nema nikakvih jedinjenja sa R_f vrednošću manjom od R_f vrednosti rafinoze. Međutim, treba istaći da se na hromatogramima većine fermentacionih podloga posle 72 sata inkubiranja još nazire mrlja u nivou monosaharida, ali je reakcija na prisustvo redukujućih šećera negativna. Verovatno da je to posledica razlika u osetljivosti kvalitativne hemijske metode i primenjene hromatografske metode. U fermentaciji galaktoze sa sojevima 112 i Č34, dok traje izdvajanje CO_2 vidi se mrlja sa R_f vrednošću istom kao R_f vrednost melibioze, što se vidi sa slike 10. Može se zaključiti, na osnovu obojenosti te mrlje da je koncentracija tog jedinjenja mala. Po prestanku izdvajanja gasa kod izolata 112 i Č34, kao i za

vreme fermentacije sa izolatom OKII8, ova supstanca u podlozi nije detektovana na hromatogramu.



S – smeša šećera (fruktoza, glukoza, galaktoza, melibioza, rafinoza)

Slika 10. Hromatogram podloge tokom fermentacije galaktoze kvascem Č34

4.2. MIKROBIOLOŠKI ASPEKTI

Mikrobiološki aspekti postavljenog cilja rada obuhvataju ogledе koji su izvedeni primenom klasičnih, najčešće korišćenih, mikrobioloških metoda u ispitivanju fiziološkog svojstva fermentacije nekog šećera. U svakom ogledu je primenjena i hromatografska metoda, za praćenje fermentacije i analizu fermentisane podloge na kraju procesa.

Iz prethodno opisanih ogleda proistekla su ispitivanja usvajanja rafinoze i melibioze, sa akcentom na fermentaciju, primenom standardizovanih fizioloških testova kod većeg broja različitih kvasaca iz sopstvene kolekcije kultura. Ovim ispitivanjima je, za većinu kvasaca preko retestiranja na navedene fiziološke karakteristike, proveravana primenljivost hromatografske metode u analizi fermentisane podloge. Pored toga, cilj ispitivanja bio je da se sagleda, prateći tok fermentacije hromatografski, distribucija pojave nedefinisanog jedinjenja u fermentisanoj podlozi.

4.2.1. Usvajanje melibioze i rafinoze kod pivskih kvasaca

Testiranje usvajanja rafinoze i melibioze sprovedeno je sa 21 izolatom kvasaca koji su u zbirci kultura označeni kao pivski kvasci i sa 3 pivska kvasaca donjeg vrenja neposredno po njihovoj reizolaciji iz pogona određenih pivara, a rezultati su predstavljeni u tabeli 6. Svi kvasci su pokazivali aeroban rast na melibiozi i rafinozi, tj. imali pozitivan test asimilacije ovih šećera. Samo jedan izolat (označen kao 253) nije fermentativno usvajao melibiozu i rafinozu, dok je kod ostalih reakcija fermentacije rafinoze pozitivna. Za 5 izolata je utvrđeno da nemaju svojstvo fermentativnog usvajanja melibioze. Jedino se kod 2 izolata (135 i 539) u testiranju fermentacije melibioze moralo odstupiti od propisane procedure pripreme inokuluma. U slučaju kada je inokulum pripreman na YM podlozi do fermentacije melibioze je posle punog perioda inkubiranja (po proceduri traje 21 dan) nekad dolazilo do fermentacije, a nekada ne. Međutim, kada je za pripremu inokuluma primenjena podloga sa galaktozom reakcija fermentacije je kod oba izolata bila pozitivna. Prema intenzitetu fermentacije jasna razlika postoji između melibioze i rafinoze. Fermentacija rafinoze kod većine izolata je brza, a samo kod nekoliko je srednja. Nasuprot tome, većina izolata fermentira melibiozu za 10 dana inkubiranja, a ostali za duže vreme, tj. kod svih je ona spora. Međutim, kada se za pripremu inokuluma primeni podloga sa galaktozom kao jedinim izvorom ugljenika fermentacija je srednja, ali nikad brza.

Kod svih izolata rađena je na kraju fermentacije provera na prisustvo rezidualnih šećera mikrobiološkom i hemijskom metodom. Izolati sa fiziološkim svojstvom fermentacije melibioze i rafinoze nisu imali u podlozi redukujućih šećera, niti je došlo do dodatne fermentacije primenom soja 112. Na osnovu ovih rezultata konstatovano je da ovi kvasci fermentativno usvajaju ceo molekul rafinoze i melibioze, što je poznata odlika pivskih kvasaca donjeg vrenja. Kod sojeva koji su imali negativan test fermentacije melibioze, a pozitivan test fermentacije rafinoze uz dosta brz kraj (prekid izdvajanja gasa i formiranje bistrog stuba podloge u epruveti) detektovano je prisustvo redukujućih šećera i dodatna fermentacija. Na osnovu tih podataka konstatovano je da ovi kvasci pokazuju aktivnost β -fruktofuranozidaze (invertaze) cepajući molekul rafinoze uz oslobađanje i fermentativno usvajanje fruktoze, a u podlozi zaostaje melibioza. Zbog toga je pozitivan test fermentacije rafinoze označen da se odvija samo sa trećinom molekula. Na osnovu ovih svojstava može se konstatovati da su to pivski kvasci gornjeg vrenja, što je za većinu i dato u opisu pri unošenju u zbirku.

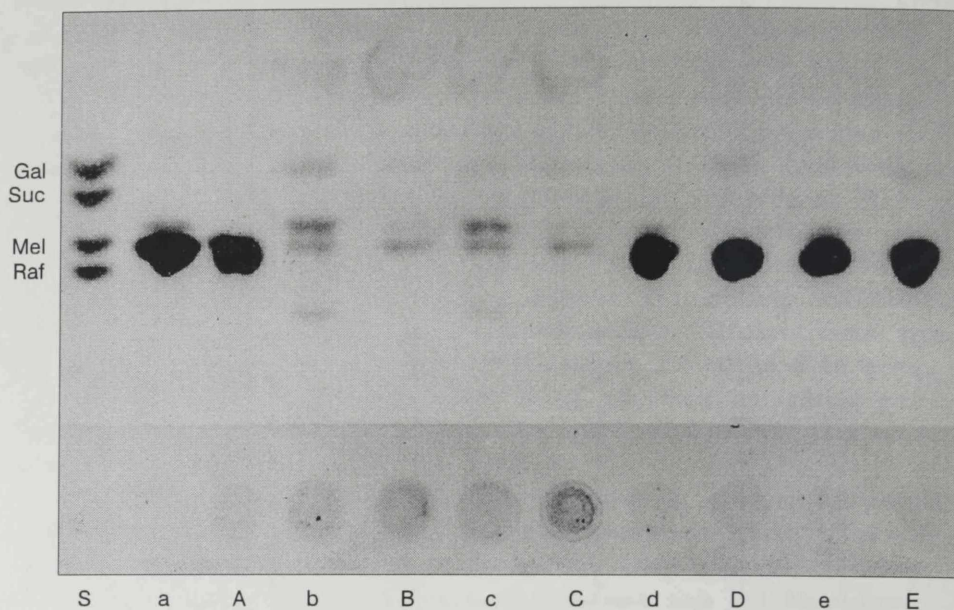
Većina testiranih pivskih kvasaca se čuva u laboratorijskim uslovima duži niz godina te je u okviru ovog ispitivanja provereno da li postoje ikakve razlike u usvajanju melibioze i rafinoze takvih izolata i reizolata iz pogonskih uslova (Sm, Vu i A) odmah po unošenju u zbirku. Na osnovu dobijenih rezultata (tabela 6) može se konstatovati da, po ispitivanim svojstvima, nema razlika među kvascima.

Tabela 6. Asimilaciona i fermentaciona sposobnost pivskih kvasaca

izolati	asimilacija		fermentacija	
	rafinoze	melibioze	rafinoze	melibioze
135	+	+	+	+/-
539	+	+	+	+/-
OKII8	+	+	+(1/3)	-
SAAZ	+	+	+(1/3)	-
253	+	+	-	-
4837	+	+	+	+
111	+	+	+	+
SM	+	+	+	+
B194HeBru	+	+	+	+
A34Rz70Nüh	+	+	+	+
OZG1	+	+	+	+
OČ1	+	+	+	+
ČA	+	+	+	+
Č34	+	+	+	+
P2-3	+	+	+	+
B-2	+	+	+	+
CO-4	+	+	+	+
1026/II	+	+	+(1/3)	-
1245/II	+	+	+(1/3)	-
BS1	+	+	+(1/3)	-
Sm	+	+	+	+
Vu	+	+	+	+
A	+	+	+	+

Analiza svih podloga primenjenih u testiranju fermentacije melibioze i rafinoze pivskim kvascima urađena je i hromatografskom metodom na HPTLC pločama. Na slici 11 dat je hromatogram fermentisanih podloga sa melibiozom, odnosno rafinozom za 5 izolata. Na osnovu poređenja R_f vrednosti mrlja iz pojedinih hromatografskih traka podloga sa R_f vrednostima čistih šećera konstatovano je da se u hromatografskim trakama pivskih kvasaca gornjeg vrenja (SAAZ, OKII8, 1026, 1275 i BS1) na kraju ogleđa vidi jasno melibioza. Treba napomenuti, a što se na slici 11 i vidi, da su u hromatografskim trakama za navedene sojeve mrlje melibioze velike i intenzivne (veoma tamne). Mala razlika

u R_f vrednosti između te melibioze i melibioze u smeši čistih šećera posledica je želje da se izbegne razređivanje što bi moglo da utiče na gubitak nekih mrlja čija je koncentracija niska. U hromatografskim trakama od izolata A34Rz70Nüh i Č34 vidi se da je u podlogama prisutno nekoliko jedinjenja. Prema R_f vrednostima zapaža se da nema rafinoze. U svim trakama detektovan je mali sadržaj melibioze i galaktoze koje nisu dokazane analizama standardizovanog testa – mikrobiološkom i hemijskom za određivanje rezidualnih šećera.



S – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza i rafinoza);
a, b, c, d, e – podloga sa melibiozom; A, B, C, D, E – podloga sa rafinozom
a, A – izolat SAAZ; b, B – izolat A34Rz70Nüh; c, C – izolat Č34; d, D – izolat 1026;
e, E – izolat 1245

Slika 11. Hromatogram fermentisanih podloga sa melibiozom ili rafinozom na kraju testa fermentacije

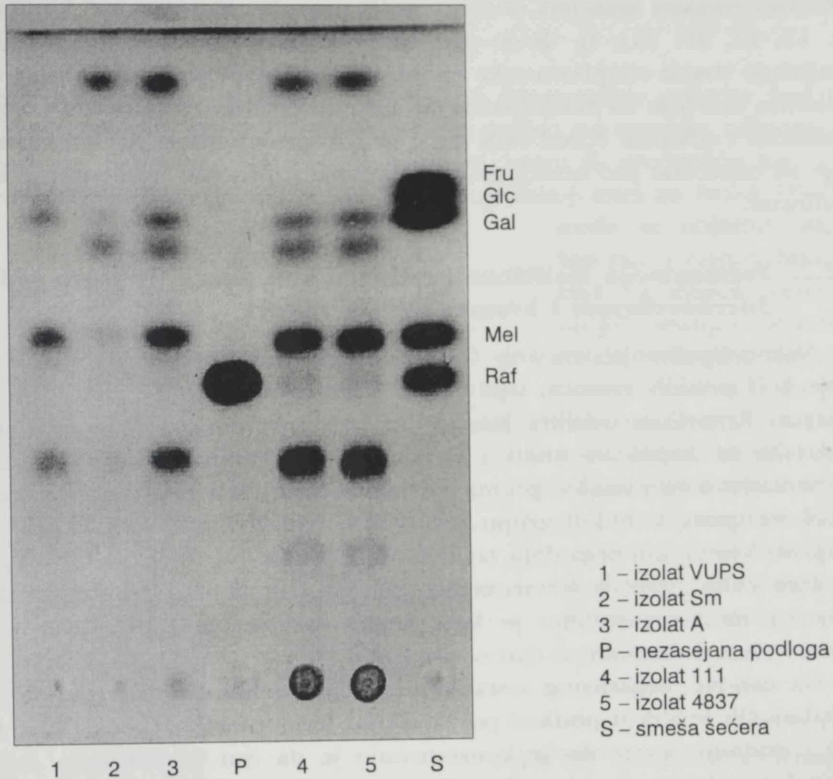
Na osnovu dobijenih rezultata određivanja preostalih šećera u podlozi primenom HPTLC metode, može se konstatovati da ovu jednostavnu metodu karakteriše sledeće:

- potrebna količina uzorka za nanošenje na ploču je veoma mala (5 μ l) što znači da ukoliko se pod sterilnim uslovima uzme alikvot za analizu (do 0,1 ml, tj. 2% od ukupne zapremine) ostatak može da se iskoristi za druge analize;
- za eksperiment se koristi direktno fermentisana podloga bez ikakve obrade što je izuzetna pogodnost jer ne treba uklanjati testirani kvasac; ova karakteristika je već zapažena kod analize sladovine i piva (97);

- brzina izvođenja (za 2,5 sata se dobija rezultat).

Na ovom mestu mogla bi se istaći još jedna karakteristika ove metode, a to je da se na osnovu fermentacije rafinoze, pod uslovom da je inokulum pripremljen na podlozi sa galaktozom kao izvorom ugljenika, može pouzdano utvrditi da li ispitivana kultura kvasca fermentira melibiozu. Time se izbegava njena direktna fermentacija što ima praktičan značaj (npr. skraćanje vremena za ispitivanje fizioloških svojstava itd.).

Kod kvasaca koji su imali pozitivan test fermentacije oba šećera, tj. kod pivskih kvasaca donjeg vrenja, praćen je tok fermentacije melibioze i rafinoze primenom hromatografije na tankom sloju silikagela G. Kao primer dat je hromatogram fermentacionih podloga sa rafinozom za 5 izolata nakon 72 sata inkubiranja (slika 12). U pojedinim hromatografskim trakama zapaža se različit broj mrlja kao i razlika u intenzitetu mrlja koje su prisutne kod svih izolata. R_f vrednosti ugljenih hidrata koji su konstituenti rafinoze date su u tabeli 7, a mrlja koje se javljaju u hromatografskim trakama (što se najbolje vidi kod izolata 111 i 4837) u tabeli 8.



Slika 12. Hromatogram fermentacionih podloga sa rafinozom za 5 kvasaca nakon 72 sata inkubiranja

Tabela 7. R_f vrednosti ugljenih hidrata konstituenata rafinoze u pokretnoj fazi metilen hlorid : glacijalna sirćetna kiselina : voda = 3,5 : 5,5 : 1

ugljeni hidrat	fruktoza	glukoza	galaktoza	saharoza	melibioza	rafinoza
$R_f \times 100$	74	71	68	62	52	46

Tabela 8. R_f vrednosti jedinjenja detektovanih u fermentacionoj podlozi pri fermentaciji rafinoze i melibioze pivskim kvascima donjeg vrenja

red. br. mrlje	1	2	3	4	5	6
$R_f \times 100$	92	68	65	52	46	34

Na osnovu poređenja R_f vrednosti čistih šećera i mrlja u hromatografskim trakama podloga može se konstatovati da mrlja sa rednim brojem 2 ima istu R_f vrednost kao galaktoza. Na ovaj način mogu se povezati i mrlja 4 sa melibiozom i mrlja 5 sa rafinozom. Poznato je da fermentacija oba šećera (melibioze i rafinoze) pivskim kvascima donjeg vrenja pripada „indirektnim“ fermentacijama (9, 11, 13, 20, 31), tj. da je prvi korak u njihovoj fermentaciji hidroliza sa spoljašnje strane citoplazmatske membrane. Identičnost R_f vrednosti i navedena činjenica upućuju na zaključak da su mrlje sa rednim brojem 2, 4 i 5 galaktoza, melibioza i rafinoza. Pored ovih mrlja na hromatogramima su detektovane mrlje koje su označene kao nedefinisana jedinjenja u procesu fermentacije melibioze i rafinoze.

4.2.2. Fermentacija melibioze i rafinoze kod drugih kvasaca roda *Saccharomyces* i kvasaca drugih rodova

Nakon ispitivanja usvajanja (oksidativnog i fermentativnog) melibioze i rafinoze kod pivskih kvasaca, ispitana je fermentacija ovih šećera kod 3 grupe kvasaca. Kriterijum odabira kvasaca za ovo ispitivanje bio je da, na osnovu podataka sa kojim su uneti i čuvaju se u laboratorijskim uslovima, imaju fermentativno svojstvo bar prema jednom šećeru. Prvu grupu čine kvasci iz roda *Saccharomyces*, narednu grupu proizvodni (vinski i pekarski) kvasci i u trećoj grupi su kvasci koji pripadaju različitim rodovima.

Fiziološko svojstvo fermentacije rafinoze i melibioze primenom standardizovanog testa sprovedeno je kod drugih kvasaca koji pripadaju rodu *Saccharomyces*, a rezultati su dati u tabeli 9.

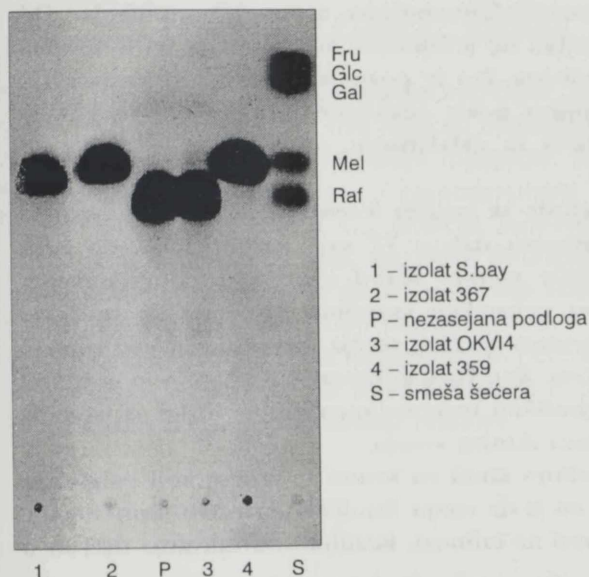
Na osnovu negativnog testa fermentacije melibioze i utvrđenog prisustva redukujućih šećera u podlozi po završetku fermentacije rafinoze kod 4 izolata, kao i dodatne fermentacije konstatovano je da oni fermentiraju rafinozu ali samo 1/3 molekula tj. oslobođenu fruktozu. Pokušaj da se odstupi od procedure pripreme inokuluma primenom agarizovane podloge sa galaktozom, što je imalo efekta kod pivskih kvasaca, nije rezultovao promenom u fermentativnom

usvajanju melibioze. Interesantno je da je priprema inokuluma primenom podloge sa galaktozom bila neobično spora. Izolati 367 i 359 usvajali su aerobno galaktozu posle dužeg inkubiranja – 10 dana za izolat 367 i 17 dana za izolat 359 što je opisano svojstvo u literaturi za ovakve kvasce (77, 98, 99). Međutim, kod izolata S.bay. je konstatovano da nema aerobnog rasta (asimilacije) na podlozi sa galaktozom što se slaže sa literaturnim opisom za ovu vrstu (79). Kod izolata OKVI4 dobijeni su takođe rezultati koji se slažu sa literaturnim (79, 80), međutim, neslaganje je u zapaženom rastu u podlozi sa rafinozom.

Tabela 9. Sposobnost fermentacija melibioze i rafinoze kod nekih kvasaca roda *Saccharomyces*

izolati	rafinoza	melibioza
367	+(1/3)	-
S.bay.	+(1/3)	-
359	+(1/3)	-
Sd	+(1/3)	-
OKVI4	-	-

Hromatografske trake podloge po završetku fermentacije rafinoze kod tih kvasaca, predstavljene slikom 13, sastavljene su jedino od ostataka rafinoze, tj. od oslobođene melibioze. Na osnovu mrlje sa istom R_f vrednošću kao i R_f vrednost melibioze koja se nazire na hromatografskoj traci za izolat OKVI4,



može se objasniti zapažen rast i razmnožavanje kod tog kvasca. Verovatno je u manjoj meri došlo do hidrolize rafinoze pošto se nazire traka melibioze, što znači da je za metaboličku aktivnost ovog kvasca iskorišćena oslobođena fruktoza. Tek posle provere čistoće te kulture moglo bi se pristupiti proučavanju ove pojave.

Slika 13. Hromatogram fermentisanih podloga sa rafinozom na kraju testa fermentacije

U narednoj grupi testirani su kvasci koji su reizolati pogonskih mikroorganizama proizvodnje vina i hleba, a rezultati su dati u tabeli 10.

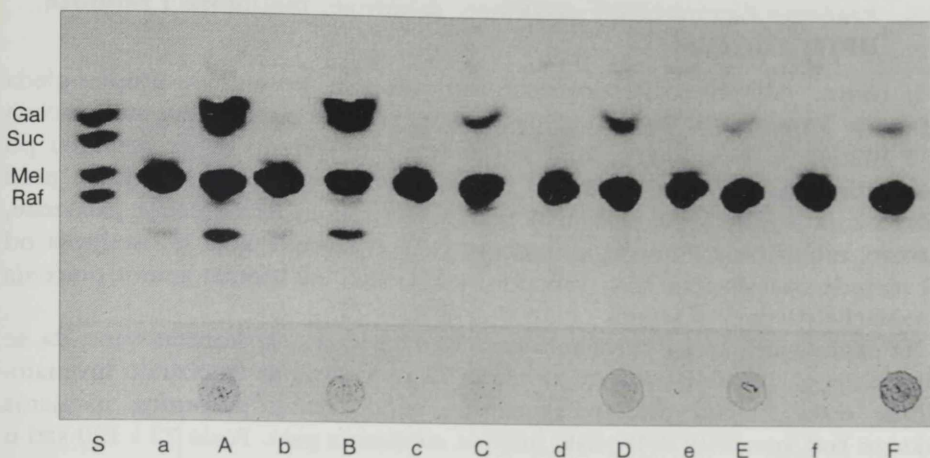
Tabela 10. Fermentaciona sposobnost rafinoze i melibioze vinskih i pekarskih kvasaca

izolati	rafinoza	melibioza
S400	+(1/3)	-
Mo	-	-
Ay	+(1/3)	-
S-3	+	+
S-1	+	+
V-6	+(1/3)	-
Epernay	+(1/3)	-
Tokajer	+(1/3)	-
cerevisiae	+(1/3)	-
DTN	+(1/3)	-
163	+(1/3)	-
Suvi6	+(1/3)	-

Od 12 kvasaca samo jedan nije imao sposobnost fermentativne razgradnje melibioze i rafinoze, a ostalih 8 vinskih kvasaca ima pozitivan test fermentacije rafinoze. Vinski kvasci koji fermentišu melibiozu usvajaju na ovaj način i ceo molekul rafinoze dok je kod ostalih fermentisana samo 1/3 molekula. Od pekarskih kvasaca (3 izolata) ni jedan ne fermentira melibiozu, a svi fermentativno razgrađuju 1/3 molekula rafinoze, što je poznata osobina tih kvasaca (9, 80). Kao i u prethodnim testiranjima posle negativne fermentacije melibioze pripreman je inokulum na podlozi za galaktozom, ali nigde nije došlo do promene fermentativnog svojstva.

Primenom hromatografske metode za analizu ferementacionih podloga, što je ilustrovano slikom 14 za 6 kvasaca nakon 72 sata fermentacije, do istih rezultata se došlo za mnogo kraće vreme. Pored toga, u hromatografskim trakama fermentisanih podloga sa pekarskim kvascima zapažene su iste one mrlje koje se nalaze kod pivskih kvasaca gornjeg vrenja. Isti je slučaj kod vinskih kvasaca koji ne fermentišu melibiozu. Kod vinskih kvasaca, kod kojih je potpuna fermentacija rafinoze, u hromatografskim trakama zapažaju se mrlje sa istim R_f vrednostima kao kod pivskih kvasaca donjeg vrenja.

Poslednju grupu testiranih kultura činili su kvasci iz zbirke koji pripadaju različitim rodovima, a zajedničko im je da imaju fiziološko svojstvo fermentacije rafinoze, pa su testovi urađeni samo na rafinozi. Rezultati određivanja dati su u tabeli 11.



S – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza i rafinoza);
 a, b, c, d, e, f – podloga sa melibiozom; A, B, C, D, E, F – podloga sa rafinozom
 a, A – izolat S; b, B – izolat S3; c, C – izolat DZ7; d, D – izolat Senta; e, E – izolat Epernay;
 f, F – izolat Tokayer

Slika 14. Hromatogram fermentacionih podloga sa melibiozom ili rafinozom za šest kvasaca nakon 72 sata inkubiranja

Tabela 11. Fermentaciona sposobnost rafinoze kod nekih kvasaca

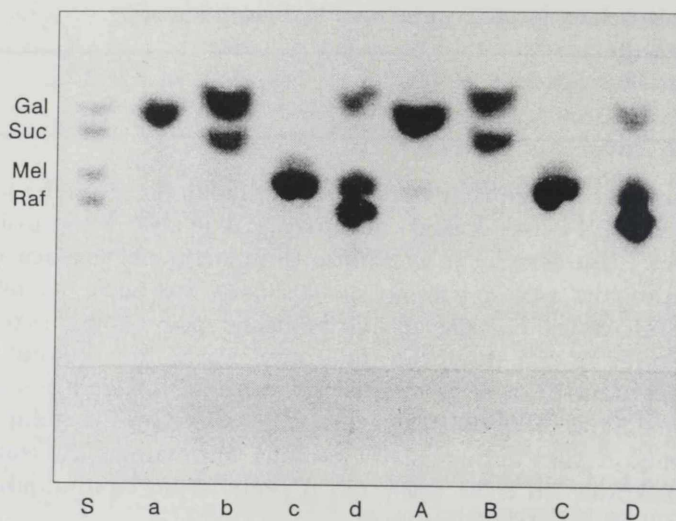
izolati	18	2	top3	top9	D ₂ B/2	C ₃₆
fermentacija	+(1/3)	+(1/3)	+(1/3)	+(1/3)	+(1/3)	+(1/3)

Za ove kvasce test fermentacije melibioze nije rađen jer je prema taksonomskim priručnicima (1, 14) ova reakcija negativna, čak je kod većine izolata (osim D₂B/2) negativan i test asimilacije melibioze. Kod prvih pet kvasaca već za 24 sata počinje izdvajanje gasa i prestaje petog dana, što znači da imaju brzu fermentaciju. Kod kvasca C₃₆ reakcija fermentacije počinje tek petog dana i završi se u narednih 72 sata. Analizom (mikrobiološkom i hemijskom) fermentisanih podloga utvrđeno je da se fermentiše samo fruktoza, a da u podlozi ostaje neiskorišćena melibioza. Ovo zapažanja brže i jednostavnije je dobijeno analizom hromatografskih traka fermentisanih podloga. Hromatografske trake se nisu ni po čemu razlikovale od traka dobijenih u prethodnim ispitivanjima kada je fermentisan samo deo molekula rafinoze.

4.2.3. Praćenje fermentacije galaktoze, saharoze, melibioze i rafinoze HPTLC metodom

U okviru mikrobioloških aspekata ispitivanja u poslednjoj grupi oglada praćena je fermentacija konstituenata rafinoze. Ogladi su izvedeni sa kvascima 112 i 1026/II, tj. kvascima za koje je poznato i provereno da se razlikuju po fermentativnom usvajanju melibioze i rafinoze. Cilj oglada je bio da se prati koliko i koja jedinjenja se javljaju u podlogama tokom fermentacije galaktoze, saharoze, melibioze i rafinoze, primenom HPTLC metode koja je osetljivija od TLC metode. Na slikama 15A, 15B, 15C i 15D dati su hromatogrami praćenja fermentacije navedenih šećera.

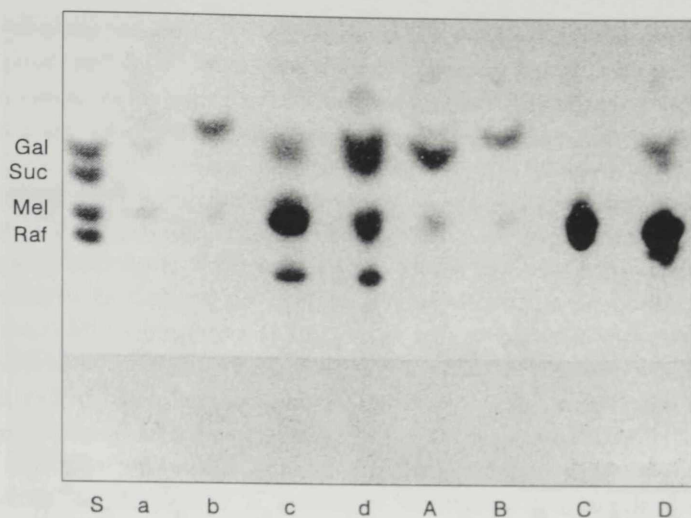
Na osnovu prestanka izdvajanja gasa za oba kvasca je konstatovano da se fermentacija galaktoze i saharoze završi za 72 sata. Kada se analiziraju hromatogramske trake za ova dva šećera zapaža se da nema potpunog usvajanja galaktoze kod kvasca 1026/II posle prekida izdvajanja gasa. Posle 72 i 120 sati u fermentisanim podlogama sa galaktozom, odnosno sa saharozom prisutna su neka organska jedinjenja čije R_f vrednosti su bliske sa R_f vrednošću melibioze. Kod izolata 112 u fermentaciji melibioze posle 48 sati od početka izdvajanja gasa kao i u fermentaciji rafinoze zapažaju se 2 mrlje sa R_f vrednošću manjom od R_f vrednosti rafinoze, a kojih nema kod kvasca 1026/II. Nakon 72 sata, manja obojenost mrlja ukazuje da je došlo do smanjenja sadržaj tih jedinjenja u



S – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza i rafinoza);

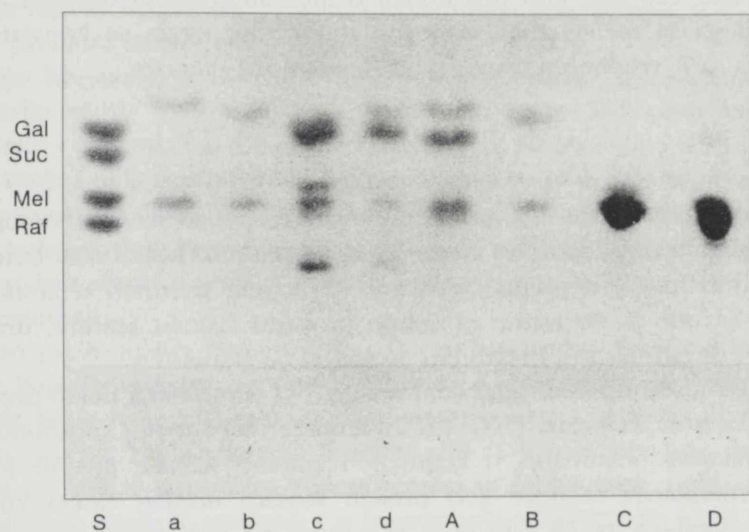
a, b, c, d – izolat 112; A, B, C, D – izolat 1026/II; a, A – podloga sa galaktozom; b, B – podloga sa saharozom; c, C – podloga sa melibiozom; d, D – podloga sa rafinozom

Slika 15A. Hromatogram fermentacionih podloga nakon 24 sata od zasejavanja



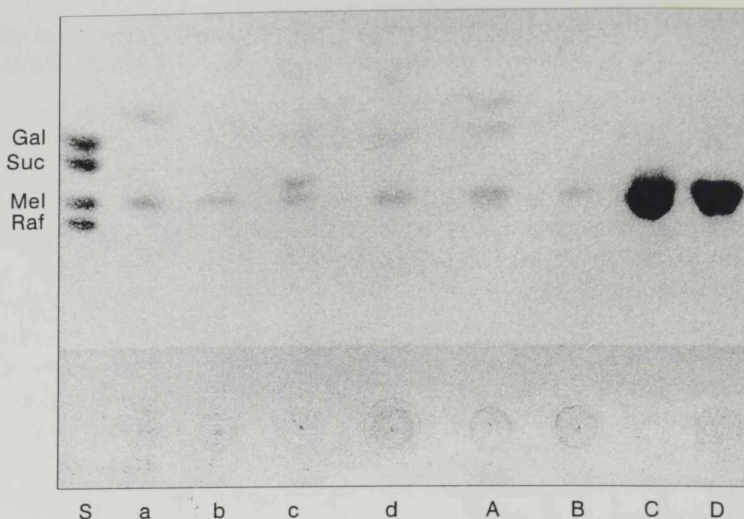
S – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza i rafinoza);
 a, b, c, d – izolat 112; A, B, C, D – izolat 1026/II; a, A – podloga sa galaktozom; b, B – podloga sa saharozom; c, C – podloga sa melibiozom; d, D – podloga sa rafinozom

Slika 15B. Hromatogram fermentacionih podloga nakon 48 sati od zasejavanja



S – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza i rafinoza);
 a, b, c, d – izolat 112; A, B, C, D – izolat 1026/II; a, A – podloga sa galaktozom; b, B – podloga sa saharozom; c, C – podloga sa melibiozom; d, D – podloga sa rafinozom

Slika 15C. Hromatogram fermentacionih podloga nakon 72 sata od zasejavanja



S – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza i rafinoza);
a, b, c, d – izolat 112; A, B, C, D – izolat 1026/II; a, A – podloga sa galaktozom; b, B – podloga sa saharozom; c, C – podloga sa melibiozom; d, D – podloga sa rafinozom

Slika 15D. Hromatogram fermentacionih podloga nakon 120 sati od zasejavanja

podlozi. Posle 120 sati, kod oba kvasca u hromatografskim trakama fermentisanih podloga sa melibiozom, odnosno rafinozom, može se konstatovati da nema mrlja sa R_f vrednošću manjom od R_f vrednosti rafinoze.

Sva sprovedena ispitivanja, pored odgovora na postavljeni cilj, omogućavala su i niz dodatnih zapažanja. Pre svega, zapaža se da neki kvasci nisu fermentisali melibiozu i rafinozu, a prema podacima sa kojima su uneti u zbirku to se očekivalo. Za njih je verovatno potrebno proveriti čistoću kulture, uraditi niz fizioloških i drugih testova i revidirati taksonomski status.

Zatim, mogu se uporediti dobijeni rezultati sa rezultatima nekih prethodnih ispitivanja sa istim kvascima (100–102). Prema fermentativnoj sposobnosti nisu zapažena nikakva odstupanja u krajnjem rezultatu. Razlike postoje jedino u trajanju fermentacije rafinoze kod pivskih kvasaca donjeg vrenja koja je u izvedenim ogledima za 24 sata duža u odnosu na literaturni podatak (100). Međutim u ovom ispitivanju to nije od primarnog značaja.

Interesantno je da ni jedan od ispitivanih kvasaca nije pokazao „stečena“ fermentativna svojstva prema melibiozi što se navodi u literaturi kao mogućnost, a posledica je dugotrajnog održavanja kultura na sladnom agaru (81) i može da promeni taksonomski status kvasca (11, 77). Ova se pojava mogla očekivati

uzimajući u obzir da se veći broj kvasaca čuva više desetina godina. Možda je odsustvo „stečene“ fermentacije posledica činjenice što se, više od 25 godina, za čuvanje kvasaca, osim vinskih koji se čuvaju na agarizovanoj širi, koristi sopstvena podloga nazvana „novi sladni“ agar (8), a koja se po količini izvora ugljenika i azota razlikuje od originalne preskripcije za sladni agar (11, 12).

Standardizovani fiziološki test fermentacije šećera propisuje pripremu inokuluma na YM agaru (11, 12). Međutim, kao što se posebno naglašava da je ponekad potrebno dodavati u tu podlogu jedan ili više vitamina, radi stimulacije rasta, verovatno bi trebalo istaći specifičnost u slučaju fermentacije melibioze. Dobijeni rezultati upućuju da je negativan test fermentacije melibioze pouzdan rezultat tek kada se u ponovljenoj probi sa inokulumom pripremljenim na podlozi sa galaktozom kao jedinim izvorom ugljenika konstatuje odsustvo gasa tokom predviđenog vremena gajenja.

Dugo čuvanje kvasaca u laboratorijskim uslovima može da rezultuje promenama koje se detektuju u fenotipu. Međutim, svi izvedeni ogledi, kao i identičnost hromatogramskih traka kvasaca iz zbirke i 3 reizolata iz pogona pivara upućuju na činjenicu da zapažene mrlje sa R_f vrednošću manjom od rafinoze nisu odlika samo ispitivanih kvasaca, već je to šira pojava kod kvasaca.

Na osnovu hromatografskih traka za mrlju sa R_f vrednošću 92 (tabela 8) može se reći da nije karakteristična samo za te kvasce već da se javlja, u manjoj ili većoj meri kao veoma uska eliptična mrlja, na većini hromatograma gde je došlo do procesa fermentacije bez obzira na korišćeni šećer i kvasac. Ovo jedinjenje nije identifikovano, a zbog frekventnosti pojavljivanja, u daljem radu, nije bilo predmet pažnje.

Analiza hromatografskih traka dobijenih u izvedenim ispitivanjima ukazuje da se mrlje sa R_f vrednošću 34 i 20 javljaju samo kod onih kvasaca koji fermentiraju i rafinozu i melibiozu, a to su u ovim ispitivanjima bili pivski kvasci donjeg vrenja i neki vinski kvasci. Pretpostavka je da ta zapažena jedinjenja nisu rezultat spontanijih hemijskih reakcija. Jedinjenje sa R_f vrednošću 20 se javlja samo u jednom delu fermentacije melibioze i rafinoze kao mrlja koja se tek nazire, pa bez obzira na malu koncentraciju ne sme se zanemariti i prevideti njeno postojanje.

Nakon prvih oglada fermentacije rafinoze ispitivanim kvascima kao mogući odgovor koje jedinjenje predstavlja mrlja sa R_f vrednošću 34 činilo se da bi mogao da bude neki oligosaharid iz rafinozinog niza – stahioza ili verbaskoza. Međutim, analiza hromatograma fermentacije melibioze upućuje da je postojanje tog jedinjenja u podlozi više povezano sa molekulom melibioze. Naime pojava mrlje sa istom R_f vrednošću u fermentaciji melibioze ne ide u prilog vezi sa rafinozinim nizom. S druge strane, spekulacija da se iz melibioze prvo sintetiše rafinoza pa potom da se dodatkom galaktozilnih ostataka na kraj molekula gde je galaktoza dalje sintetišu viši članovi tog niza, nema eksperimentalnu potvrdu. Ni u jednom hromatogramu, pri fermentaciji melibioze, nema jedinjenja sa R_f vrednošću koje odgovara rafinozi. Pored toga, teško bi bilo dati

odgovor na pitanje zašto se takav proces odvija i koliko je on energetski opravdan.

Najverovatnije da je to neka enzimaska reakcija koja se paralelno odvija sa hidrolizom. Međutim u objašnjenju kako se odvija proces fermentacije rafinoze i melibioze, za postojanje ove reakcije nisu pronađeni literaturni podaci. Za pivske kvasce donjeg vrenja fermentativno razlaganje melibioze počinje delovanjem α -galaktozidaze sa spoljašnje strane ćelijske membrane, a potom sledi transport i razgradnja, unutar ćelije, glukoze i galaktoze. Na osnovu pojave jedinjenja u podlozi sa istim R_f vrednostima kao što ih imaju glukoza i galaktoza, zaključeno je da su ti šećeri nastali hidrolizom melibioze. Kako su svi hromatogrami dobijeni pod istim uslovima, moguće je izvesti određena zapažanja koja su usmerena ka kvantifikaciji procesa fermentacije. Postojanje galaktoze i glukoze u fermentisanoj podlozi, što se vidi na slici 15b, upućuje da je proces hidrolize melibioze brži nego transport koji je naredna etapa procesa fermentacije. Isto je utvrđeno i za proces fermentacije saharoze gde se hidroliza odvija mnogo brže i povezana je ne samo sa brzinom transporta već i sa brzinom intraćelijske razgradnje monosaharida (27).

Nakon prestanka izdvajanja gasa u fermentisanim podlogama sa rafinozom, odnosno melibiozom detektovanog jedinjenja sa R_f vrednošću 34 ima malo. Na osnovu zapažanja da se najveći sadržaj tog jedinjenja u podlozi uočava tokom fermentativnog procesa, a ne na kraju procesa fermentacije može se zaključiti da to nije fermentativni nuzprodukt. Nastanak tokom procesa i smanjenje na kraju dozvoljava da se tom jedinjenju pripiše intermedijerno svojstvo.

U svim ispitivanjima tokom rada veoma često su uzimani uzorci, iz različitih epruveta, radi mikrobiološke kontrole sterilnosti i morfološkog stanja ćelija. Istovremeno je bojenjem nativnih preparata sa metilenskim plavim proveravana i vitalnost populacije ispitivanih kultura kvasaca. Ni u jednom mikroskopskom pregledu nije zapažena kontaminacija bakterijama, niti veći broj delova ćelija. Zanimljiv udeo u populaciji je bio obojen plavo, tj. ni u jednom ogledu nije došlo do izražaja odumiranje ćelija ili njihovo fiziološko slabljenje.

4.3. NEKI ASPEKTI PROCESA FERMENTACIJE RAFINOZE I MELIBIOZE

Nastajanje nedefinisanog jedinjenja sa R_f vrednošću 34 u fermentaciji rafinoze i melibioze određenim kvascima podstakla je ispitivanja u kojima su varirani neki od uslova u odnosu na standardizovani test fermentacije. Cilj ovih ogleda je da se sagleda da li variranje tih činilaca utiče na promenu sastava jedinjenja koja se mogu detektovati u fermentacionoj podlozi.

Od brojnih činilaca koji utiču na optimalni tok svakog biotehnološkog procesa izdvojeni su i ispitivani samo oni koji neće bitno izmeniti fermentativni test. Primenjeni činiooci su podeljeni u 3 grupe. U prvoj grupi su oni činiooci koji

bi se mogli zbirno nazvati variranje inokuluma, a drugu grupu čini variranje podloge, dok su u trećoj grupi uslovi gajenja.

U ovim ispitivanjima korišćen je soj 112 kao referentni i pivski kvasac označen kao Č34. Tok procesa fermentacije praćen je u određenim vremenskim intervalima hromatografskom metodom na tankom sloju silikagela.

U izvedenim ogledima nisu rađene analize kvantitativnog tipa iz više razloga. Za određivanje sadržaja rafinoze i melibioze tokom procesa fermentacije izbor metode kako to uraditi je limitiran. Nekoliko pogodnih metoda (određivanje redukujućih šećera, enzimatska) zbog prisustva glukoze i galaktoze u podlozi ne bi pružile direktan odgovor. Pregledom literature konstatovano je da se za ispitivanje promena u toku fermentacije melibioze, koje se odnose na vanćelijski deo procesa, umesto nje koristi neki od galaktozida, a detektuje se oslobođeno hromoforno jedinjenje (9). Ovakav tip supstrata, kao što je *p*-nitrofenil- α -D-galaktopiranozid (54), se često koristi u biohemijskim ispitivanjima (62). Međutim, pošto je zapaženi intermedijer detektovan u sredini gde su prisutni prirodni šećer i ćelije kvasca, i pošto hromoforna jedinjenja nisu prirodni šećeri u ovom radu nisu preduzeta ispitivanja sa njima. Za potpunu kvantifikaciju procesa trebalo bi pratiti nivo fermentacije i koncentracije ekstracelularnih jedinjenja, među njima i zaostalih šećera u podlozi, uz uvažavanje činjenice da to nije dovoljno. Recimo, samo na teorijskom planu glukoza i etanol su povezani odnosom 1:2, a u realnom sistemu deo glukoze se troši na formiranje makromolekula u ćeliji i na nuzprodukte fermentacije (103).

4.3.1. Variranje inokuluma

Za ispitivanje uticaja inokuluma na fermentaciju rafinoze i melibioze varirana je:

- količina inokuluma i
- priprema inokuluma na različitim podlogama.

Prema proceduri standardizovanog testa fermentacije koristi se veoma gust inokulum da se ograniči delovanje rastvorenog kiseonika u podlozi i da se spreči ćelijska proliferacija. Međutim, baš sprečavanje rasta ćelija ometa početak fermentacije koja se odvija nakon formiranja adaptivnih enzima (11, 12). Smatra se da je melibiaza, tj. α -galaktozidaza, enzim koji hidrolizuje cepanje melibioze, kod kvasaca adaptivni enzim (33). S druge strane, poznato je da su veličina inokuluma, uz temperaturu i sastav podloge najvažniji faktori za vreme fermentacije u pivarstvu (104). U ovom ogledu podloge su zasejane sa 10 puta manjim brojem ćelija u odnosu na standardni postupak inokulisanja.

Vizuelnim praćenjem fermentacije zapažena je jedino razlika u vremenu izdvajanja gasa u fermentaciji rafinoze za oba ispitivana soja. Kada je podloga zasejana sa 10 puta manjim brojem ćelija vidljiv početak izdvajanja gasa je za 4–5 sati kasnije nego kod uobičajenog inokuluma. Kod fermentacije melibioze nisu zapažene razlike. Na osnovu izgleda hromatograma može se reći da nema

bitnijih razlika u odnosu na one koji su dobijani u prethodnom delu ispitivanja (slika 12). Jedina razlika u hromatogramima je pojava rafinoze i posle 48 sati fermentacije što ukazuje da reakcija hidrolize rafinoze u ovom ispitivanju duže traje.

Za test fermentacije različitih šećera kao inokulum kvasnih ćelija koristi se suspenzija kulture u sterilnoj vodi sprana sa YM ili sladnog agara. Poznato je da kvasac koji je gajen u podlozi sa glukozom ne može odmah da fermentira galaktozu već nakon perioda adaptacije (13). Takođe je poznato da fermentacija melibioze pripada grupi „adaptivnih fermentacija“ (20) pa se inokulum priprema inkubiranjem u podlozi gde je izvor ugljenika jedan od sledećih ugljenih hidrata: melibioza, rafinoza ili galaktoza (29).

Za pripremu inokuluma korišćen je YM agar, novi sladni agar, i agarizovane podloge za fermentaciju sa galaktozom, melibiozom i rafinozom, kao i modifikovane asimilacione čvrste podloge (YNB i galaktoza, tj. rafinoza).

U fermentaciji rafinoze nisu zapažene razlike između podloga sa kojih je pripreman inokulum, ali se razlike javljaju u fermentaciji melibioze. Po vremenu početka izdvajanja gasa podloge se mogu podeliti u dve grupe: u prvoj su YM agar i novi sladni agar, a ostale primenjene podloge su u drugoj grupi. Kada se primenjuju podloge sa glukozom (YM i novi sladni agar) kao osnovnim izvorom ugljenika fermentacija melibioze počinje od 5.-og do 11.-og dana, a uglavnom 7–8.-og dana što znači da se može okarakterisati kao spora („long-term“) adaptacija (20). Kod druge grupe primenjenih podloga nisu zapažene razlike u vremenu početka i dužini trajanja fermentacije, a uzimajući u obzir da je početak fermentacije između trećeg i petog dana ova adaptacija se može označiti kao srednja (20). Na osnovu ovih rezultata zaključeno je da se za pripremu inokuluma kao najpodesnija koristi galaktoza uz korigovanje pH vrednosti podloge pre sterilizacije na 5,5 da tokom termičkog tretmana ne dođe do promena koje su opisane kao epimerizacija aldoza i aldehidnog dela ketoza (16).

Hromatogrami fermentacionih podloga sa rafinozom bez obzira na primenjenu podlogu za pripremu inokuluma nisu se razlikovali od onih koji su već urađeni (slika 12). Hromatogrami fermentacionih podloga sa melibiozom takođe se nisu bitno razlikovali od onih koji su dobijeni u prethodnim ispitivanjima. Jedina razlika u ovim hromatogramima je što se primenom druge grupe podloga za pripremu inokuluma neidentifikovani intermedijer sa R_f vrednošću 34 detektuje nekoliko sati pre nego što počne vidljivo izdvajanje gasa.

4.3.2. Variranje podloge

Podloga za fermentaciju pored šećera kao jedinog izvora C-atoma sadrži izvore azota i druga hraniva potrebna za rast i sve neophodne sinteze. Izmene u podlozi usmerene su ka variranju sadržaja izvora C-atoma i tipa izvora N-atoma. Pre svega, ispitano je koje se supstance javljaju u fermentacionoj podlozi, ako se primene 10 puta manje koncentracije šećera nego što je to u testu fermentacije, tj. one koncentracije melibioze i rafinoze koje su mnogo bliže koncentracijama šećera primenjenim u testovima asimilacije. Pored toga ispitano je kakav efekat

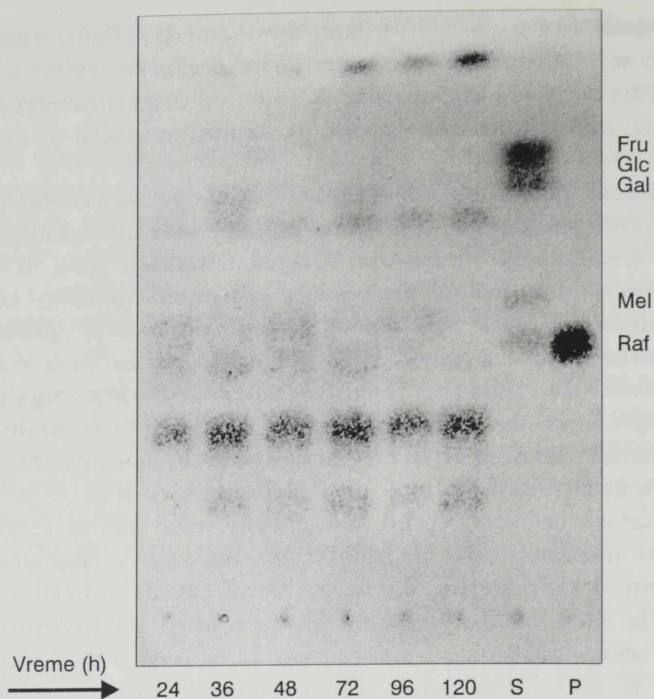
ima dodavanje galaktoze u podlogu tokom fermentacije rafinoze. Kod izvora N atoma variranje se odnosilo sa jedne strane na organske izvore azota, tj. na smanjenje sadržaja ekstrakta kvasca na 0,2% (40% od originalne recepture), a sa druge strane na neorganski izvor azota, tj. amonijum-sulfat iz asimilacione podloge.

Tok fermentacije praćen vizuelno nije se bitnije razlikovao od prethodnih rezultata primenom podloge sa deset puta manjim sadržajem rafinoze. Razlika se uočava kod fermentacije melibioze. Početak izdvajanja gasa, u vidu sitnih mehurića, vidljiva je tek nakon protresanja epruvete, njihovim izlaskom na površinu, a nema uobičajenog nakupljanja gasa u durhamovoj epruveti.

Hromatografska analiza fermentisanih podloga sa deset puta manjim sadržajem šećera (melibioze i rafinoze) rađena je nakon koncentrovanja podloga na 1/10 početne zapremine. Broj mrlja i njihove R_f vrednosti odgovaraju onim koje su dobijene u standardizovanom fermentacionom testu sa ovim kvascima.

Dalja ispitivanja su bila usmerena na sagledavanje da li će se iz podloge za fermentaciju rafinoze dobijati iste hromatografske trake ako se tokom procesa doda konstituent molekula rafinoze i melibioze. Na osnovu činjenica da kvasce roda *Saccharomyces* karakteriše intenzivna fermentacija i najmanje količine glukoze (80) i da visok sadržaj glukoze u podlozi može da izazove kataboličku represiju (105) dodavanje glukoze nije rađeno. Zbog toga je urađeno dodavanje galaktoze i to u toku uobičajenog fermentacionog procesa. Ovaj šećer je dodavan kada je hidroliza rafinoze počela pa je u podlozi prisutna i melibioza. Sterilni rastvor galaktoze je dodat u tolikoj količini da se zapremina ne promeni više od 10%, a istovremeno da se dobije 1% rastvor galaktoze u podlozi. Na proces fermentacije rafinoze ovaj dodatak galaktoze utiče tako što se vizuelno zapaža da izdvajanje gasa traje duže za 24 do 36 sati u odnosu na vreme kada uobičajeno prestaje izdvajanje gasa. Na hromatogramu, datom na slici 16, se jasno vidi da i na kraju fermentacije, tj. po prestanku izdvajanja gasa u podlozi ima još dosta ispitivanog jedinjenja sa R_f vrednošću 34. Ovaj rezultat upućuje na spekulaciju da dodata galaktoza utiče na nivo usvajanja ispitivanog jedinjenja iz podloge.

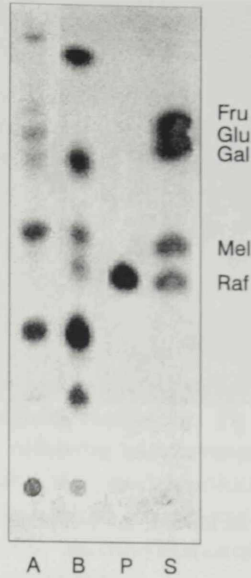
Variranje sadržaja izvora azota, nije dovelo ni do kakvih vidljivih promena koje bi se opazale tokom fermentacije. U svim hromatogramima se javljaju identične mrlje, za oba šećera i za oba kvasca, u odnosu na one koje su prethodno dobijene. Za izvođenje testa fermentacije podloga po sastavu treba da je što približnija optimalnoj za razviće kvašćevih kultura. Za ispitivane kulture pri fermentaciji melibioze i rafinoze može se konstatovati da je 0,2% kvašćevog ekstrakta dovoljna količina izvora azota i mikroelemenata. Takođe se može konstatovati da je dovoljna i pogodna količina N u amonijum-sulfatu. Često se ovakve podloge nazivaju i minimalnim podlogama, u smislu dostupne količine bitnih elemenata za metabolizam (106). U ovim ogleđima primenjena je kvašćeva azotna osnova (YNB) koja sadrži veći broj vitamina i mikroelemenata u tragovima (88). Smatra se da ista količina etanola nastaje iz podloga sa samim amonijumovim jonom kao i sa lako usvajajućim izvorima azota sa dodatkom



S – smeša šećera; P – nezasejana podloga

Slika 16. Hromatogram fermentacije rafinoze sa dodatkom galaktoze posle 36 sati od zasejavanja

faktora rasta (107). Iako je konstatovano da nema razlika u broju i R_f vrednosti mrlja u hromatografskim trakama, zapažena je razlika u samom izgledu trake što je ilustrovano primerom na slici 17. Naime, primenom kvašćevog ekstrakta dobijaju se hromatografske trake na kojima pored jasno odvojenih mrlja šećera i neidentifikovanih jedinjenja, vide se i neke nečistoće između njih. Tih „muzgi“ nema kada je izvor azota YNB, tj. kada se koristi YNB u hromatografskim trakama između mrlja nema nikakvih nečistoća.



S – smeša šećera; P – nezasejana podloga

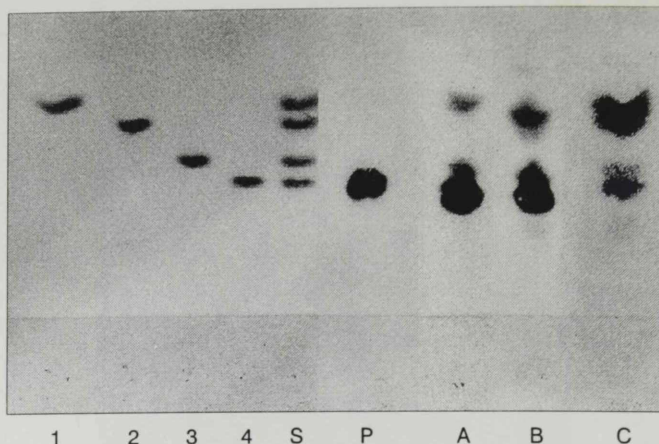
Slika 17. Hromatogram suvog ostatka podloge sa YNB (A) i kvašćevim ekstraktom (B) iz fermentacije rafinoze

4.3.3. Variranje uslova gajenja

Od brojnih uslova gajenja, ili ekoloških činilaca, ispitivan je uticaj temperature i efekat dostupnog kiseonika na zastupljenost različitih jedinjenja u podlozi.

Fermentacija rafinoze je izvedena na 12°C, a ova temperatura je odabrana jer je upotrebljen pivski kvasac. Poznato je da se temperatura od 12°C primenjuje u proizvodnji piva što znači da je odstupljeno od fiziološkog testa za više od 13°C, ali je i ova temperatura unutar kardinalnih tački razvoja. Iako je primenjena temperatura pogodna za manifestovanje životne aktivnosti kod pivskih kvasaca, vizuelnim pregledom su zapažene razlike u vremenu početka i trajanju fermentacije. Izdvajanje gasa počinje posle 48 sati, a intenzivno je i posle 8 dana gajenja. Ovi rezultati nisu iznenađujući kada se uzme u obzir poznati odnos brzine hemijske reakcije i temperature (55). U hromatografskim trakama, što je predstavljeno na slici 18, vidi se da po broju jedinjenja u podlozi posle 96 sati reakcija fermentacije nije završena.

Unutar klasičnog testa fermentacije urađen je i ogled čija je postavka bila drugačija. Podloga za fermentaciju rafinoze (20 ml) nalazila se u erlenmajer boci od 100 ml i na uobičajen način zasejana. Tokom inkubiranja podloga je više



1 – galaktoza; 2 – saharoza; 3 – melibioza; 4 – rafinoza; 5 – smeša šećera (galaktoza, saharoza, melibioza, rafinoza); P – nezasejana podloga

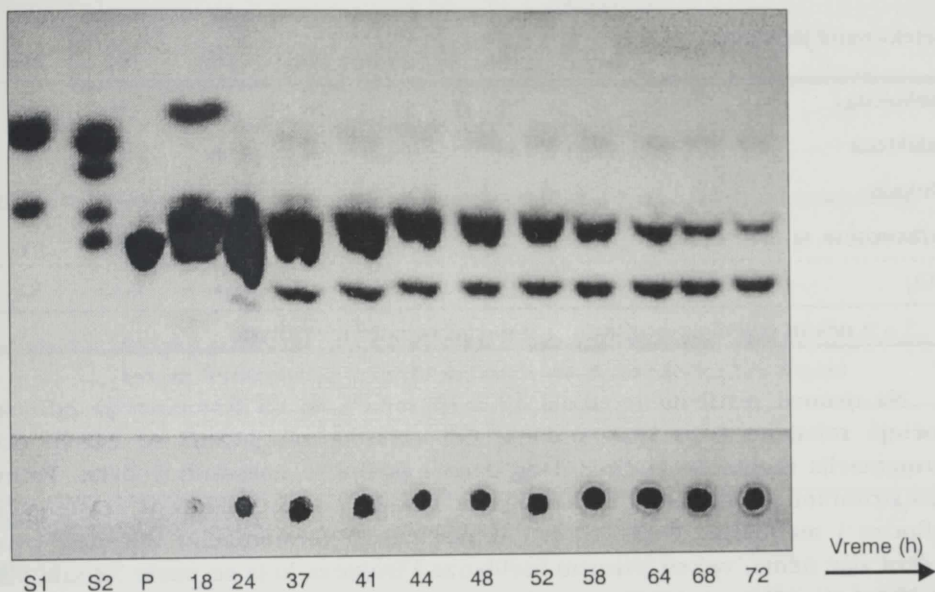
Slika 18. Hromatogrami fermentisanih podloga posle 24 (A), 48 (B) i 96 (C) sati od zasejavanja

puta u toku dana promešana. Time je omogućeno mnogo više dostupnog kiseonika zasejanoj kulturi. Kod oba kvasca u hromatografskim trakama iz pojedinih vremena nisu zapažene nikakve razlike u broju i R_f vrednostima tih mrlja u odnosu na već opisane hromatografske trake.

Na osnovu izvedenih oglada sa variranjem činilaca koji bi mogli uticati na proces fermentacije može se izvesti nekoliko zaključaka. Pre svega, ni jedna promena u odnosu na standardizovani fiziološki test nije dovela do odsustva formiranja ispitivanog jedinjenja sa R_f vrednošću 34. Variranje inokuluma, kao i sniženje temperature, utiče na brzinu fermentacije rafinoze i melibioze, ali ne i na kvalitativni sastav jedinjenja u podlozi. Promena izvora azota, količina dostupnog kiseonika, kao i za deset puta manja količina rafinoze i melibioze, takođe nemaju bitnijeg uticaja na sastav jedinjenja u fermentacionoj podlozi. Razlika postoji samo kada se u proces fermentacije rafinoze doda galaktoza, jer fermentacija rafinoze tada duže traje i na kraju procesa je u podlozi prisutna znatna količina ispitivanog jedinjenja.

4.3.4. Određivanje sadržaja ispitivanog jedinjenja u fermentacionim podlogama

Uzimajući u obzir da napred ispitani činioci procesa fermentacije rafinoze i melibioze ne menjaju kvalitativni izgled hromatografskih traka sledeći korak u ispitivanju se odnosio na određivanje kvantitativnih odnosa detektovanih jedinjenja u podlozi. Na osnovu višestrukog vremenskog praćenja sastava fermentisane podloge metodom tankoslojne hromatografije visokog učinka, što na primeru fermentacije rafinoze ilustruje slika 19, utvrđeno je u kojim vremenskim intervalima se javljaju određena jedinjenja u podlozi (tabele 12 i 13). U postupku pripreme fermentacionih uzoraka za kvantitativno određivanje jedinjenja u podlozi, datom u poglavlju Materijal i metode, bilo je potrebno utvrditi primenljivost jonoizmenjivačkih smola i kvantifikovati proces dejonizacije. Iz nanete podloge sa koncentracijom melibioze 2% ili rafinoze 4%, šećeri se kvantitativno izdvajaju, tj. nema njihovog zadržavanja u kolonama sa katjonskom (jako kiselom) i anjonskom (slabo baznom) smolom. Nasuprot tome, kod jako bazne smole oko 50% suve materije uzorka se zadrži u koloni. Kapacitet ovih smola bio je 1 g katjonske smole za 30 ml i 1 g anjonske smole za 20 ml nezasejane podloge pa je za propuštanje 10 ml podloge iz fermentacionog procesa uzeto da je po 1 g obe smole. Primer jednog HPLC hromatograma ovako tretiranih uzoraka fermentacionih podloga dat je na slici 20. Rezultati kvantitativnog određivanja sadržaja jedinjenja u podlozi metodom HPLC dati su u tabelama 14 i 15.



S1 – smeša šećera (fruktoza, glukoza, melibioza); S2 – smeša šećera (glukoza, galaktoza, saharoza, melibioza, rafinoza); P – nezasejana podloga.

Slika 19. Hromatogram fermentacije rafinoze

Tabela 12. Hromatografsko i vizuelno praćenje fermentacije rafinoze kvascima *Saccharomyces cerevisiae* (soj 112 i izolat Č34)

detektovana jedinjenja	v r e m e (h)									
	24	48	72	96	>96	24	48	72	96	>96
	soj 112					izolat Č34				
rafinoza	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
melibioza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galaktoza	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
glukoza	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
fruktoza	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
INTERMEDIJER sa $R_f=34$	-	+	+	+	+/- ^a	-	+	+	+	+/-
CO ₂	+/-	+	+	+/-	-	+/-	+	+	+/-	-

^a – u nekim ogleđima pozitivan, a u nekim negativan rezultat

Tabela 13. Hromatografsko i vizuelno praćenje fermentacije melibioze sa *Saccharomyces cerevisiae* soj 112

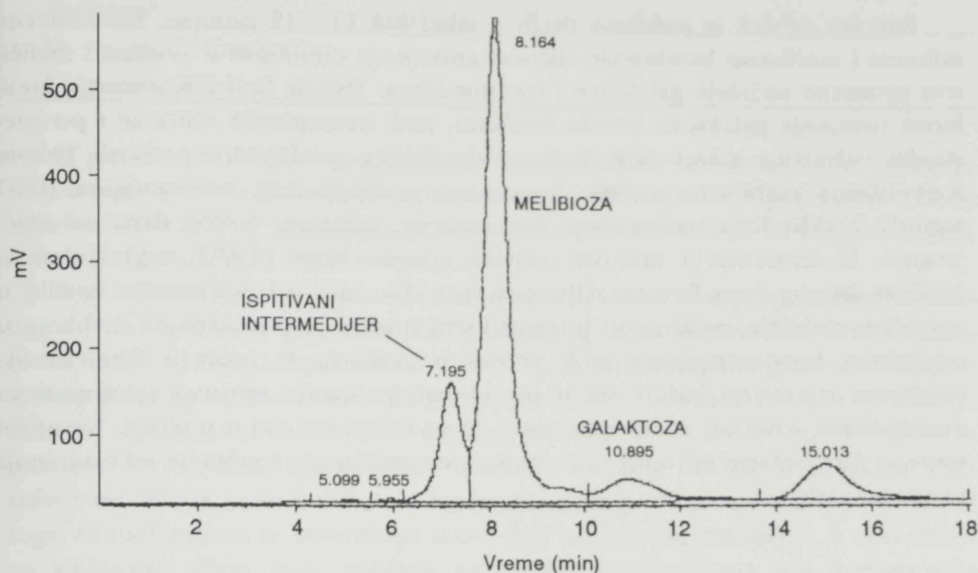
detektovana jedinjenja	v r e m e (h)						
	0-96	108	120	144	168	192	216
melibioza	+	+	+	+	+	+	+
galaktoza	-	+	+	+	+	+	+
glukoza	-	-	+	+	-	-	-
INTERMEDIJER sa $R_f=34$	-	-	+/- ^a	+	+	+	+
CO ₂	-	+/-	+	+	+	+/-	-

^a – u nekim ogleđima pozitivan, a u nekim negativan rezultat

Na osnovu rezultata iz tabela 12 i 13 zapaža se da fermentacija rafinoze počinje relativno brzo i za 4 dana, od trenutka zasejavanja se završi, dok fermentacija melibioze počinje 5-og dana i odvija se narednih 5 dana. Prema detektovanim jedinjenjima u podlogama takođe postoji razlika u fermentaciji rafinoze i melibioze. Posle 48 sati u podlozi za fermentaciju rafinoze, ovog šećera više nema, već su prisutni melibioza i fruktoza koja se posle 72 sata više ne detektuje. Već posle 48 sati od zasejavanja u istoj podlozi ima galaktoza i glukoza. Ovi monosaharidi se u podlozi sa melibiozom javljaju tek 5-og dana od zasejavanja. Ove razlike u vremenu, kada počinje cepanje molekula melibioze i melibioznog dela molekula rafinoze, nije posledica adaptacije kulture kvasca, jer

je inokulum gajen na adaptivnoj podlozi (29), već se verovatno može pripisati razlikama u broju ćelija kvasaca u podlozi. Naime, u obe podloge u startu se nalazi oko 2×10^6 ćelija po ml podloge, određeno direktnom i indirektnom metodom. Nakon 48 sati fermentacije rafinoze broj ćelija kvasaca je oko 5×10^7 (1/ml), dok je kod podloge sa melibiozom petog dana od zasejavanja bilo 6×10^6 ćelija/ml.

Ispitivani intermedijer prati proces fermentacije oba šećera, tj. pre pojave gasa nema ga u podlozi. Međutim, njegovo potpuno nestajanje iz podloga ne poklapa se sa završetkom izdvajanja gasa.



Slika 20. Hromatogram podloge fermentacije melibioze nakon 144h od zasejavanja

Tabela 14. Sadržaj melibioze, galaktoze i ispitivanog intermedijera ($R_f=34$) u podlozi tokom fermentacije rafinoze sa *Sacch. cerevisiae* soj 112, u mg/ml

	v r e m e (h)				
	24	48	72	96	120
melibioza (neiskorišćena)	19,9	12,8	5,9	3,1	1,0
galaktoza	0,32	0,73	0,56	0,74	0,72
intermedijer	0,49	1,48	1,32	1,33	1,05

Tabela 15. Sadržaj melibioze, galaktoze i ispitivanog intermedijera ($R_f=34$) u podlozi tokom fermentacije melibioze sa *Sacch. cerevisiae* soj 112, u mg/ml

	v r e m e (h)			
	120	144	168	192
melibioza (neiskorišćena)	13,2	11,6	2,9	3,4
galaktoza	2,12	1,62	0,39	0,24
intermedijer	0,86	0,87	0,23	0,17

Kao što se vidi iz rezultata datih u tabelama 14 i 15 procese, fermentacije rafinoze i melibioze karakteriše sličnost smanjenja melibioze u podlozi i različitost promene sadržaja galaktoze i intermedijera. Dok je kod fermentacije melibioze usvajanje galaktoze veoma izraženo, kod fermentacije rafinoze i po prestanku izdvajanja gasa ostaje dosta neiskorišćene galaktoze u podlozi. Tokom fermentacije melibioze najveća koncentracija ispitivanog intermedijera (0,87 mg/ml) je određena trećeg dana fermentacije, odnosno šestog dana od zasejavanja. U fermentaciji rafinoze najviše intermedijera (1,483 mg/ml) ima u podlozi drugog dana fermentacije, odnosno dva dana od zasejavanja. Razlika u najvećem sadržaju ispitivanog intermedijera možda je povezana sa razlikom u inicijalnim koncentracijama ovih šećera u podlozi. U procesu fermentacije melibioze ispitivano jedinjenje u potpunosti pokazuje svojstvo intermedijera metabolizma – nastaje i vremenom mu se smanjuje sadržaj u podlozi. Nasuprot tome, u fermentaciji rafinoze nastajanje intermedijera je izraženije od smanjenja njegovog sadržaja.

4.4. IZOLACIJA I PREČIŠĆAVANJE INTERMEDIJERA

Kod izdvajanja čistog intermedijera pre svega je bilo potrebno odrediti kada prekinuti fermentacioni proces. Pri tome treba imati u vidu da je na raspolaganju, nakon uklanjanja ćelija i propuštanja uzorka preko jonoizmenjivačkih smola, dosta ograničena količina šećera iz podloge, što ilustruju podaci iz tabele 16. Na osnovu rezultata određivanja sadržaja ispitivanog intermedijera u fermentaciji rafinoze, odnosno melibioze, zaključeno je da je najpogodnije posle 36 do 48 sati od početka izdvajanja gasa kod oba šećera. Iako na kraju procesa fermentacije rafinoze u podlozi ima još dosta ispitivanog jedinjenja ovo vreme je eliminisano jer se tada u podlozi nalaze i brojni ekstracelularni produkti metabolizma kvasaca.

Obrada fermentisanog uzorka izvedena je na uobičajeni način, što je dato u poglavlju Materijal i metode. Treba naglasiti da nije rađeno uklanjanje proteina (18) što se navodi kao uobičajeni deo procedure jer probom kuvanja uzorka

nije dobijen talog. Pored toga, nije rađeno ni obezbojavanje (108) jer je uzorak nakon koncentrovanja do suva bio beo i penast.

Tabela 16. Promena ukupnog sadržaja šećera u podlozi tokom fermentacije rafinoze i melibioze sa *Sacch. cerevisiae* soj 112, u mg/ml

šećer	v r e m e (h)				
	24	48	72	96	120
rafinoza ^a	23,0	16,5	8,7	6,2	3,8
melibioza ^b	16,6	15,8	4,1	3,8	–

^a – (vreme od zasejavanja)

^b – (vreme od pojave gasa)

U procesu izolacije i prečišćavanja intermedijera iz fermentisane podloge primenjeno je nekoliko različitih hromatografskih metoda. Čistoća izdvojenog intermedijera u svim primenjenim metodama proveravana je HPTLC metodom, a za nekoliko uzoraka i HPLC metodom.

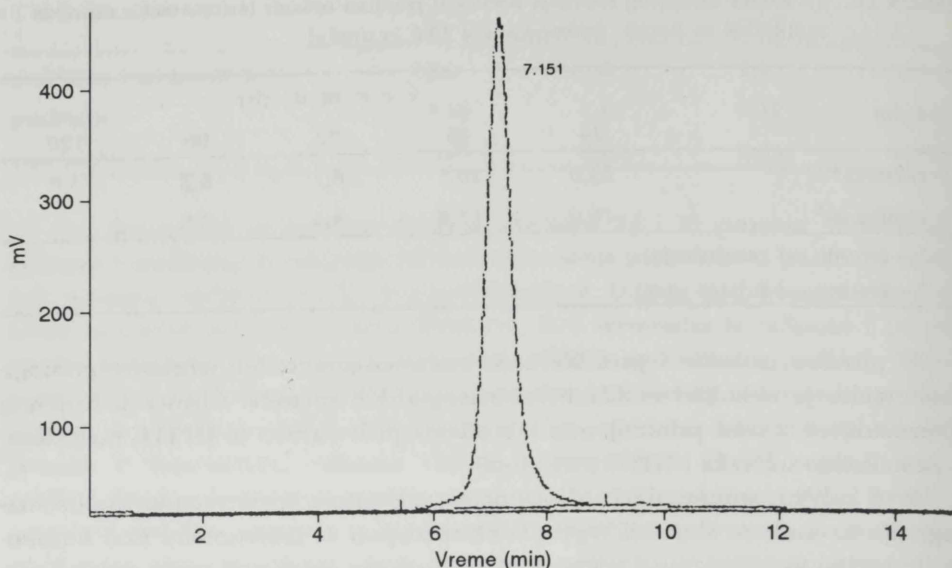
Prve količine intermedijera dobijene su primenom semipreparativne hromatografije na tankom sloju silikagela G ekstrakcijom sa metanolom. Kod fermentacije melibioze (prekinuta nakon 42h od početka izdvajanja gasa) dobijeno je 0,1% jedinjenja računato na količinu upotrebljene melibioze, a iz fermentacije rafinoze (prekinuta nakon 38h od zasejavanja) dobijeno je 0,2% jedinjenja računato na količinu upotrebljene rafinoze. Očito je da su ovim postupkom izdvojene veoma male količine iz fermentacionih podloga za oba šećera. Pored toga, sa metanolom se ekstrahuje samo deo ispitivanog jedinjenja, a deo ostaje na silikagelu. Zbog male količine izdvojenog intermedijera ova metoda nije korišćena u daljem radu.

Za izdvajanje intermedijera korišćena je i kolonska hromatografija sa silikagelom 60 kao nepokretnom fazom. Ispitivani intermedijer se javlja od 27. do 39. frakcije, ali samo u četiri frakcije (od 31 do 35) eluat je sadržavao samo njega, što ilustruje slika 21. Iz fermentacije rafinoze (prekinuta 38h od zasejavanja) dobijeno je 0,25% jedinjenja računato na primenjeni šećer, što ukazuje da je i ovim postupkom izdvojeno malo čistog intermedijera. Višestruko ponavljanje postupka kolonske hromatografije sa objedinjenim frakcijama gde je pretežno prisutan intermedijer, ali ima i melibioze, pokazao se takođe neracionalan u odnosu na količinu dobijene čiste supstance (po nekoliko mg).

Naredna primenjena metoda je kolonska hromatografija sa silikagelom G kao nepokretnom fazom i pokretnom fazom sledećeg sastava: metilen hlorid : glacijalna sirćetna kiselina : metanol (3 : 4 : 3, v/v/v). Ostvareni prinos čistog intermedijera bio je 0,23% računato na polaznu melibiozu.

Da bi se dobila potrebna količina čistog intermedijera, pored navedenih postupaka testirane su i druge pokretne faze metodom tankoslojne hromato-

grafije da bi se primenile u kolonskoj hromatografiji, ali nije ostvareno bolje razdvajanje jedinjenja iz fermentisane podloge.



Slika 21. Hromatogram izdvojenog čistog intermedijera

Na osnovu dobijenih količina čistog intermedijera iz opisanih postupaka za njegovo direktno izdvajanje zaključeno je da ni jedna metoda nije dovoljno efikasna. Zbog toga je izmenjen pristup ovom problemu. Prema novom konceptu kolonska hromatografija sa silikagelom 60 i pokretnom fazom metilen hlorid : glacijalna sirćetna kiselina : voda (3,5 : 5,5 : 1, v/v/v) je korišćena za dobijanje samo delimično prečišćenog uzorka (odstranjeni monosaharidi, najveći deo melibioze i jedinjenja sa R_f vrednošću 20). Dobijena bezvodna smeša je acetilovana i hromatografski su razdvojeni acetilovani intermedijer od druga dva acetilovana jedinjenja, da bi čist acetilovani intermedijer potom dezacetilovan. Dakle, prečišćavanje intermedijera urađeno je preko acetilovanja smeše. Provera izvodljivosti ovog postupka urađena je sa melibiozom čiji su IR spektri pre acetilovanja i posle dezacetilovanja isti. Za hromatografsko razdvajanje acetilovane smeše bilo je potrebno pronaći odgovarajuću pokretnu fazu metodom TLC, da bi se ona primenila u kolonskoj hromatografiji. Od većeg broja preliminarno testiranih pokretnih faza izabrano je nekoliko za određivanje R_f vrednosti acetilovanih jedinjenja melibioze, intermedijera i jedinjenja sa R_f vrednošću 20, a rezultati tih određivanja dati su u tabeli 17.

Tabela 17. R_f vrednosti acetilovanih jedinjenja na TLC pločama

sastav pokretne faze	odnos	$R_f \times 100$		
		Me ^a	D ^b	Dd ^c
cikloheksan : etil acetat	1:1,5	45	38	30
ugljen tetrahlorid : etil acetat	1:1	56	39	23
toluol : etil acetat	5,5:4,5	48	39	29
cikloheksan : etil acetat : aceton	2:2,75:0,25	45	54	76
toluol : etil acetat : aceton	6:3,5:0,5	49	41	25

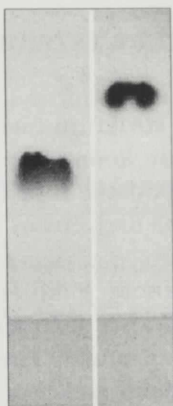
^a – acetilovana melibioza

^b – ispitivani acetilovani intermedijer

^c – acetilovano jedinjenje koje se kao slobodno javlja ispod ispitivanog intermedijera

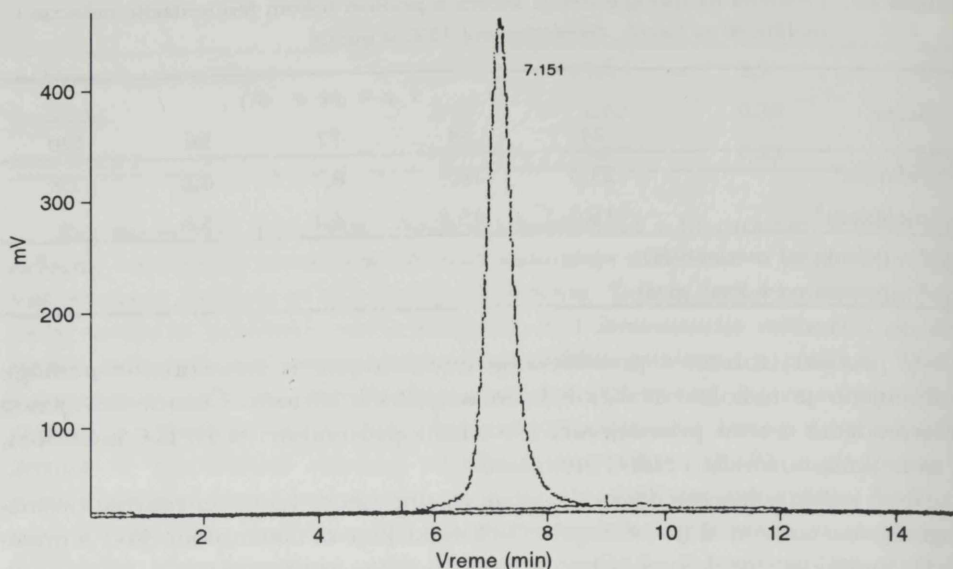
Na osnovu R_f vrednosti i izgleda hromatograma za dalji rad odabrane su dve pokretne faze sledećeg sastava: (a) toluol : etil acetat (5,5 : 4,5; v/v) i (b) cikloheksan : etil acetat : aceton (2 : 2,75 : 0,25; v/v/v).

Prilikom acetilovanja uzoraka, što je potvrđeno u više ponavljanja, masa uzoraka se uvek povećavala oko 95%. Razdvajanje acetilovane smeše rađeno je kolonskom hromatografijom sa silikagelom G kao nepokretnom fazom. Acetilovana melibioza se javlja od 47. do 54. frakcije, a ispitivani acetilovani intermedijer u frakcijama od 56. do 65., ali je u poslednje tri frakcije detektovano i naredno jedinjenje. Ovim postupkom dobijen je prinos od 25% čistog acetilovanog intermedijera računato na polaznu acetilovanu smešu, a čistoća izdvojenog ispitivanog acetilovanog intermedijera ispitana je metodom HPTLC sa gore navedenim pokretnim fazama, što ilustruje slika 22.



Slika 22. Hromatogrami acetilovanog intermedijera

grafije da bi se primenile u kolonskoj hromatografiji, ali nije ostvareno bolje razdvajanje jedinjenja iz fermentisane podloge.



Slika 21. Hromatogram izdvojenog čistog intermedijera

Na osnovu dobijenih količina čistog intermedijera iz opisanih postupaka za njegovo direktno izdvajanje zaključeno je da ni jedna metoda nije dovoljno efikasna. Zbog toga je izmenjen pristup ovom problemu. Prema novom konceptu kolonska hromatografija sa silikagelom 60 i pokretnom fazom metilen hlorid : glacijalna sirćetna kiselina : voda (3,5 : 5,5 : 1, v/v/v) je korišćena za dobijanje samo delimično prečišćenog uzorka (odstranjeni monosaharidi, najveći deo melibioze i jedinjenja sa R_f vrednošću 20). Dobijena bezvodna smeša je acilovana i hromatografski su razdvojeni acilovani intermedijer od druga dva acilovana jedinjenja, da bi čist acilovani intermedijer potom dezacilovan. Dakle, prečišćavanje intermedijera urađeno je preko acilovanja smeše. Provera izvodljivosti ovog postupka urađena je sa melibiozom čiji su IR spektri pre acilovanja i posle dezacilovanja isti. Za hromatografsko razdvajanje acilovane smeše bilo je potrebno pronaći odgovarajuću pokretnu fazu metodom TLC, da bi se ona primenila u kolonskoj hromatografiji. Od većeg broja preliminarno testiranih pokretnih faza izabrano je nekoliko za određivanje R_f vrednosti acilovanih jedinjenja melibioze, intermedijera i jedinjenja sa R_f vrednošću 20, a rezultati tih određivanja dati su u tabeli 17.

Tabela 17. R_f vrednosti acetilovanih jedinjenja na TLC pločama

sastav pokretne faze	odnos	$R_f \times 100$		
		Mel ^a	D ^b	Dd ^c
cikloheksan : etil acetat	1:1,5	45	38	30
ugljen tetrahlorid : etil acetat	1:1	56	39	23
toluol : etil acetat	5,5:4,5	48	39	29
cikloheksan : etil acetat : aceton	2:2,75:0,25	45	54	76
toluol : etil acetat : aceton	6:3,5:0,5	49	41	25

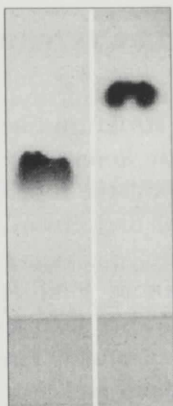
^a – acetilovana melibioza

^b – ispitivani acetilovani intermedijer

^c – acetilovano jedinjenje koje se kao slobodno javlja ispod ispitivanog intermedijera

Na osnovu R_f vrednosti i izgleda hromatograma za dalji rad odabrane su dve pokretne faze sledećeg sastava: (a) toluol : etil acetat (5,5 : 4,5; v/v) i (b) cikloheksan : etil acetat : aceton (2 : 2,75 : 0,25; v/v/v).

Prilikom acetilovanja uzoraka, što je potvrđeno u više ponavljanja, masa uzoraka se uvek povećavala oko 95%. Razdvajanje acetilovane smeše rađeno je kolonskom hromatografijom sa silikagelom G kao nepokretnom fazom. Acetilovana melibioza se javlja od 47. do 54. frakcije, a ispitivani acetilovani intermedijer u frakcijama od 56. do 65., ali je u poslednje tri frakcije detektovano i naredno jedinjenje. Ovim postupkom dobijen je prinos od 25% čistog acetilovanog intermedijera računato na polaznu acetilovanu smešu, a čistoća izdvojenog ispitivanog acetilovanog intermedijera ispitana je metodom HPTLC sa gore navedenim pokretnim fazama, što ilustruje slika 22.



Slika 22. Hromatogrami acetilovanog intermedijera

Dezacetilovanjem i izdvajanjem intermedijera ostvaren je prinos od 40% računato na acetilovani intermedijer. U odnosu na polaznu delimično prečišćenu smešu to je 20% čistog intermedijera. Ako se dobijena količina izrazi u odnosu na polazni šećer, u većini oglada rafinoza – zbog dostupnosti i cene, to je oko 0,5%. Ovakvom procedurom izolovanja i prečišćavanja u značajnoj mери povećana je količina čistog intermedijera. Međutim, ako se uporedi količina intermedijera od 2,5% u odnosu na rafinozu, utvrđena metodom HPLC (tabela 14), sa ostvarenim prinosom očigledno je da se na ovaj način izoluje samo petina formiranog intermedijera. Treba napomenuti da, iako je u ovom radu usvojen ovaj postupak za dobijanje veće količine čiste supstance, ovi rezultati ukazuju na potrebu daljeg rada na iznalaženja postupka kojim bi se ostvario veći prinos u izdvajanju ispitivanog intermedijera.

U biologiji, biotehnologiji i nizu prehrambenih tehnologija analiza ugljenih hidrata je značajna i dosta se koristi, pa je opisano niz direktnih postupaka izdvajanja pojedinih jedinjenja. Međutim, u ovom radu za izolovanje i prečišćavanje ispitivanog intermedijera iz fermentacionih uzoraka takvi postupci nisu primenjeni iz više razloga. Umesto korišćene kolonske hromatografije sa silikagelom, bila bi primenljiva neka druga kolonska hromatografija kao što je sa aktivnim ugljem i podeona hromatografija sa jonoizmenjivačima (109), ali je za ove metode poznat niz nedostataka. Zbog toga one nisu primenjene već je problem dobijanja čistog intermedijera rešen primenom poznatog postupka – delimično prečišćavanje, acetilovanje, razdvajanje, dezacetilovanje. Ovaj postupak, pored dobrog razdvajanja jedinjenja iz fermentisanih podloga karakteriše i mnogo veći broj etapa koje utiču na smanjenje prinosa. Prema literaturnim podacima, prednost u rešavanju ovog problema bi imale metode HPLC i gel permeabilne hromatografije (110).

4.5. ODREĐIVANJE STRUKTURE INTERMEĐIJERA

Ispitivanja koja se odnose na strukturu intermedijera mogu se podeliti u dve grupe. U prvoj grupi su ogledi kojima je trebalo na osnovu kvalitativnih pokazatelja dobiti orijentacione podatke o prirodi ispitivanog intermedijera, a u drugoj grupi su ogledi sa izdvojenim čistim intermedijerom koji se direktno koriste za ispitivanje strukture.

Kvalitativni podaci o ispitivanom jedinjenju dobijeni su, primenom TLC metode, upoređivanjem R_f vrednosti jedinjenja iz fermentisane podloge sa jedinjenjima koji su mogući nuzprodukti fermentacije. Pri tome su hromatogrami izazivani sa određenim brojem različitih reagenasa (111).

Poznato je da različite organske kiseline takođe mogu biti završni proizvodi u fermentaciji ugljenih hidrata (112). Neke od ovih kiselina – pirogroždana, ćilibarna, jabučna i mlečna ispitane su metodom TLC kao pojedinačne i u smeši

sa glukozom i galaktozom. Na osnovu R_f vrednosti ovih kiselina, kao i na osnovu izgleda mrlja, konstatovano je da ispitivani intermedijer nije ni jedna od navedenih kiselina.

Prisustvo nekih od fosforilisanih oblika monosaharida ne bi se očekivalo zbog toga što je u svim fermentacijama svakodnevno kontrolisana vitalnost ćelija kvasca i nije zapažen veći broj mrtvih ćelija. Izgled i mesto mrlja za ispitani glukoza-6-fosfat i fruktoza-1,6-fosfat eliminišu mogućnost da je intermedijer neki od ovih fosforilisanih šećera.

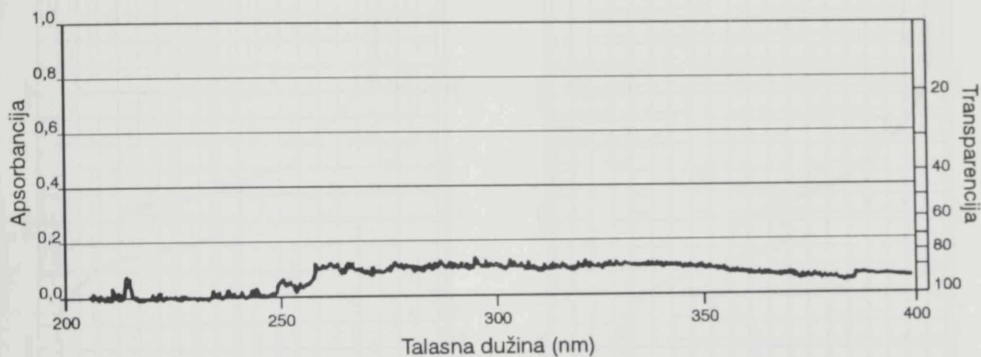
Ispitivani intermedijer nije ni aminošećer što je potvrđeno izazivanjem hromatograma sa ninhidrinskim reagensom.

Analiza tankoslojnom hromatografijom koja se odnosila direktno na strukturu jedinjenja bila je provera da li intermedijer ima redukujuću grupu. Pozitivna reakcija sa reagensima olovo tetraacetatom i anilin difenilamin fosfatom utvrđeno je da intermedijer pripada grupi jedinjenja sa redukujućom grupom. Ovaj rezultat je potvrđen sa pozitivnom kvalitativnom dokaznom reakcijom za redukujuće šećere korišćenjem čistog intermedijera.

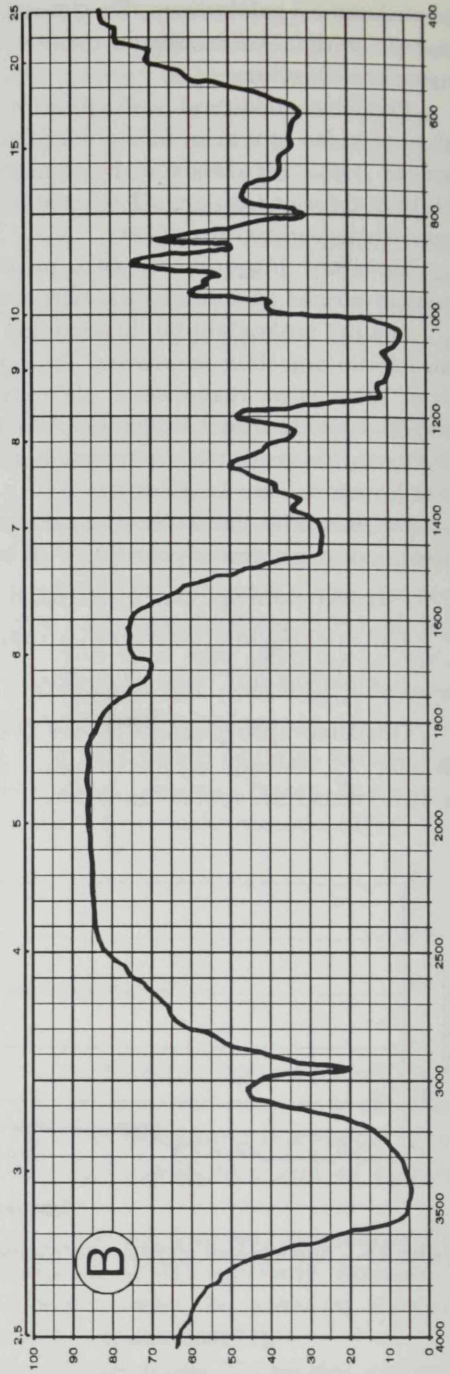
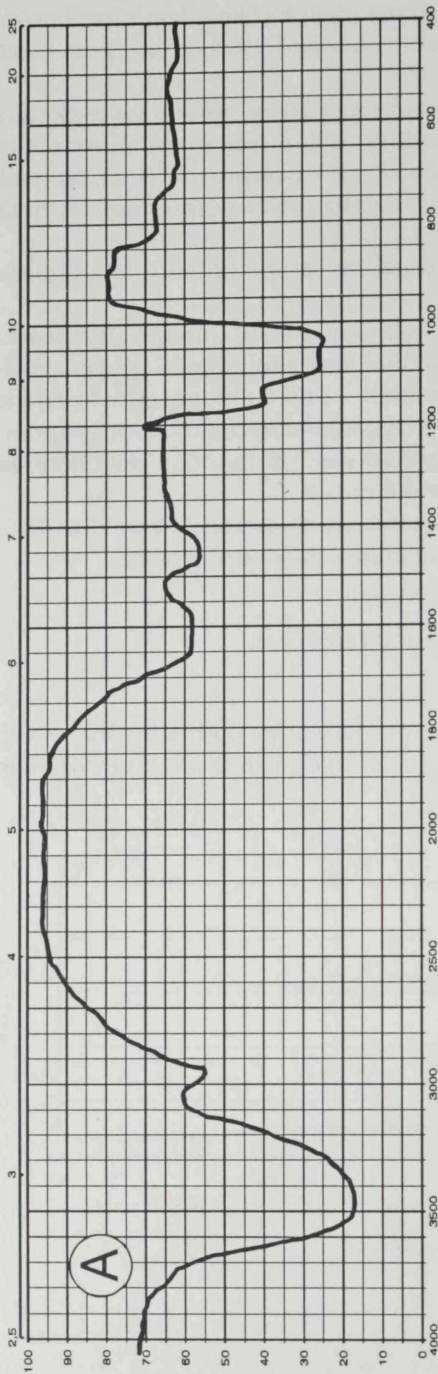
Dalja ispitivanja sa čistim intermedijerom bila su usmerena na analize koje bi ukazale na njegovu prirodu. U tu svrhu su snimljeni sledeći spektri:

- apsorpcioni spektar u području 200–400 nm
- IR spektar intermedijera i acetilovanog intermedijera
- „elektro-sprej“ maseni spektar.

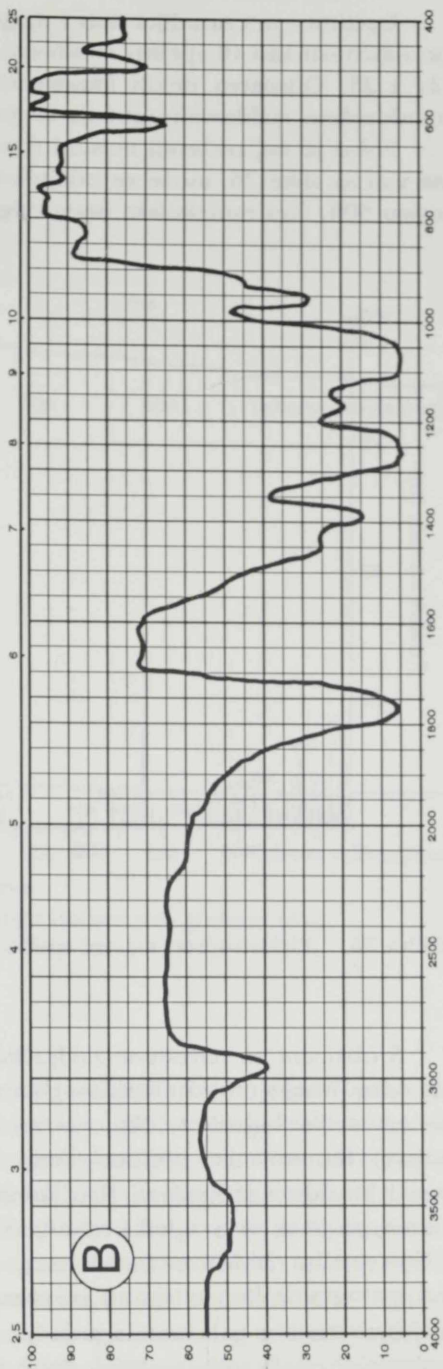
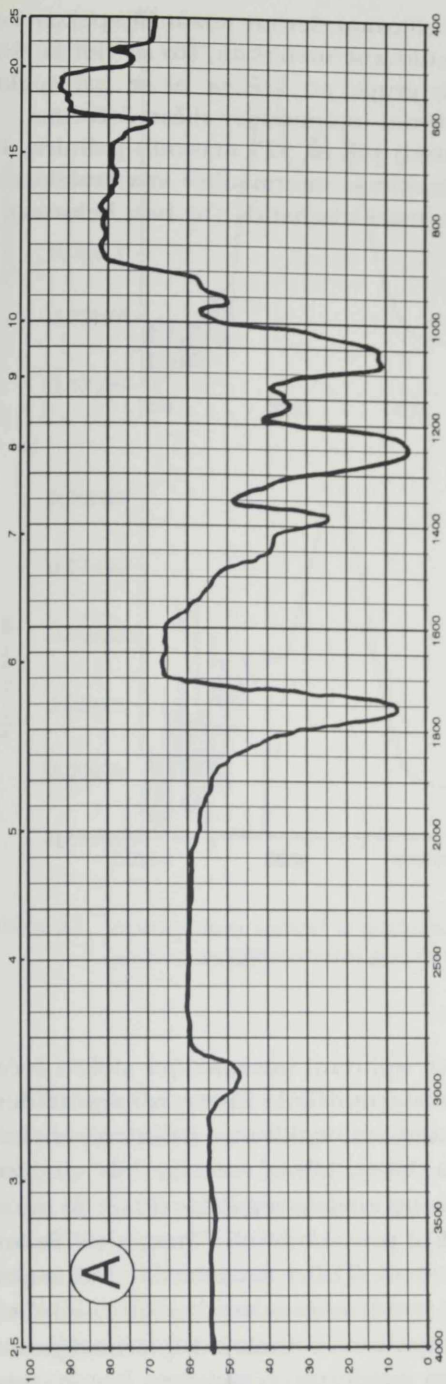
Odsustvo apsorpcionih pikova u ispitivanom talasnom području, što se vidi sa slike 23, ukazuje da intermedijer nema grupa koje bi to izazvale, tj. dobijen je karakterističan spektar za šećere.



Slika 23. Apsorpcioni spektar ispitivanog intermedijera



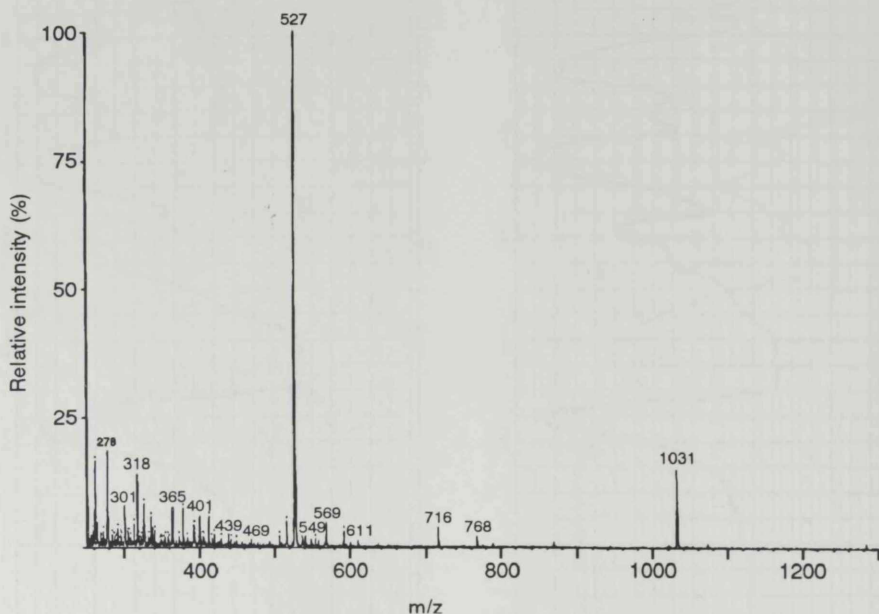
Slika 24. IR spektar ispitivanog intermedijera (A) i melibioze (B)



Slika 25. IR spektar acetilovanih oblika ispitivanog intermedijera (A) i melibioze (B)

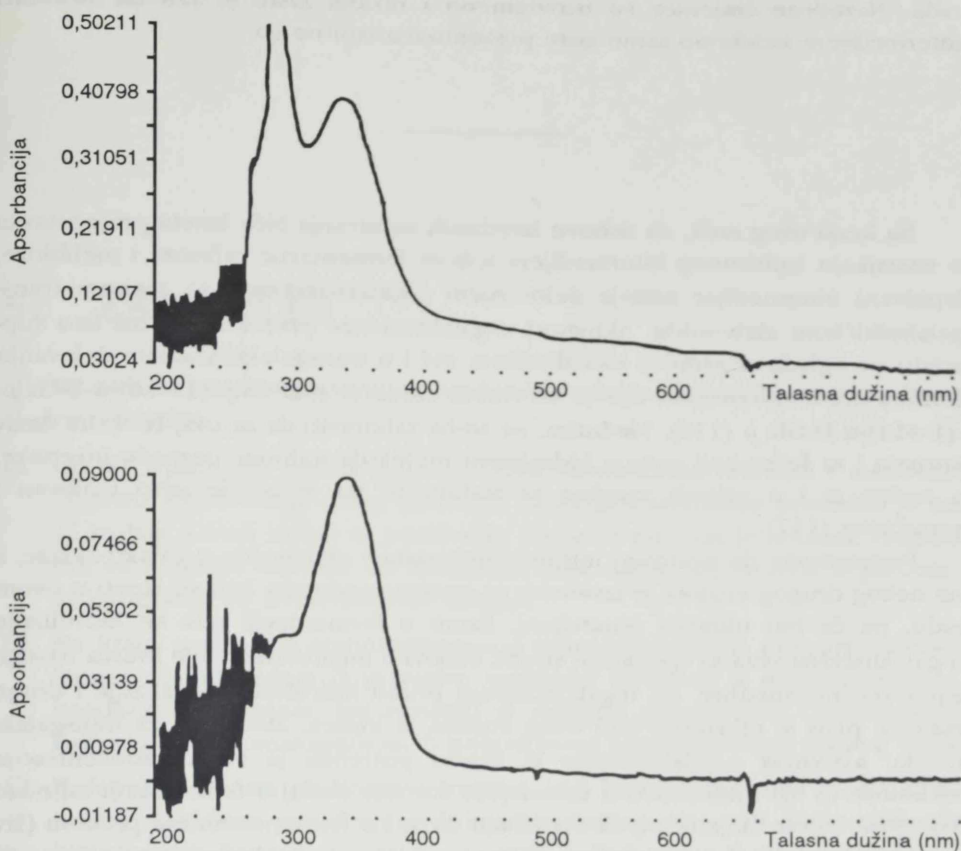
Ispitivani intermedijer kao i njegov acetilovani derivat imaju IR spektar koji je skoro isti kao IR spektri melibioze i acetilovane melibioze, što se vidi sa slika 24 i 25. Odsustvo nekih karakterističnih grupa po kojima bi se ovi spektri međusobno razlikovali upućuju da je ispitivani intermedijer sličan šećerima.

Pošto je najizraženiji maseni (molekulski) pik na 527 masenih jedinica, što se vidi sa slike 26, može se zaključiti da ispitivani intermedijer ima molekulsku masu 504. Ova molekulska masa odgovara masi trisaharida (na bazi heksoza).



Slika 26. „Elektro-sprej“ maseni spektar ispitivanog intermedijera

S obzirom na navedene zaključke da je ispitivani intermedijer složen šećer, za određivanje monosaharida – konstituentna molekula intermedijera urađena je enzimska hidroliza. Na osnovu činjenice da ispitivano jedinjenje nestaje tokom fermentacije pretpostvljeno je da bi za takvu reakciju bila podesna α -galaktozidaza iz kvasaca. Kao komercijalnog enzima α -galaktozidaze iz kvasca nema, pa je za ovaj ogled primenjen soj 112 prema metodi Clancy-a i Whelan-a (75). Analiza hidrolizata rađena je metodom TLC i enzimatski. Na osnovu hromatograma konstatovano je prisustvo samo monosaharida, što znači da je najverovatnije α -galaktozidaza potpuno hidrolizovala molekul intermedijera. Iz enzimskih dokaznih reakcija na prisustvo galaktoze i glukoze, što je predstavljeno slikom 27, utvrđeno je da je ispitivani intermedijer sastavljen od glukoze i galaktoze.



Slika 27. Apsorpcioni spektri u enzimskom testu dokazivanja glukoze (A) i galaktoze (B)

Kompletna analiza nekog prirodnog oligosaharida, tj. njegovo potpuno definisanje, smatra se komplikovanim problemom naročito stoga što je u prirodi moguća skoro svaka kombinacija povezivanja monosaharida. Veoma često se ističe da su za određivanje strukture, ugljeni hidrati višestruko komplikovaniji molekuli od nukleinskih kiselina i peptida (113). Da bi se odredila struktura oligosaharida treba odrediti sedam elemenata veoma različitim hemijskim ili fizičko-hemijskim postupcima (114), a za realizaciju toga neophodno je imati na raspolaganju dovoljnu količinu supstance. S druge strane, u glikobiologiji, tj. oblasti gde se proučavaju ugljeni hidrati živih ćelija, veoma često se izoluju samo miligramske količine supstance pa je to uslovalo razradu i primenu visoko sofisticiranih instrumentalnih metoda čija primena nije realizovana u okviru ovog

rada. Navedene činjenice su istovremeno i razlozi zašto je rad na strukturi intermedijera sadržavao samo gore prezentirana ispitivanja.

Na kraju ovog rada, na osnovu izvedenih ispitivanja biće izneta pretpostavka o nastajanju ispitivanog intermedijera tokom fermentacije rafinoze i melibioze. Ispitivani intermedijer nastaje delovanjem α -galaktozidaze i to njenom transgalakolitičkom aktivnošću. Aktivnost α -galaktozidaze prema melibiozi kao substratu ne ogleda se samo u hidrolitičkom već i u transgalakolitičkom delovanju formirajući maninotriozu čija je struktura sledeća: α -D-Galp-(1 \rightarrow L6)- α -D-Galp-(1 \rightarrow L4)- α -D-Glc p (116). Međutim, ne treba zaboraviti da se ovaj trivijalni naziv koristio i za šećer koji nastaje hidrolizom molekula stahioze pomoću invertaze, a nađen je i u prirodi zajedno sa stahiozom pa je odatle prvo izolovan i proučavan (117).

Pretpostavka da ispitivani intermedijer nastaje aktivnošću α -galaktozidaze, a ne nekog drugog enzima je izvedena na osnovu podataka koji su izneti u ovom radu, pa će biti ukratko ponovljeni. Samo u fermentaciji gde se hidrolizuje α -galaktozidna veza sa spoljašnje strane osnovne membrane ćelije kvasca nastaje ispitivani intermedijer. Da α -galaktozidaza pored hidrolitičke katalizuje i druge reakcije prvo je otkriveno kod ovog enzima iz kvasca. Međutim, za transgalakolitičku aktivnost α -galaktozidaze iz kvasca potrebna je visoka koncentracija melibioze (3 M) i kontrolisani uslovi (73) što nije slučaj u fermentaciji rafinoze kvascima. Iznete činjenice ipak dopuštaju da se i u fermentacionom procesu (živ organizam – ćelije kvasca i šećer – rafinoza, odnosno melibioza) odvija slična ili ista reakcija kao u reakcionoj smeši (enzim – melibioza).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja urađenih u okviru ovog rada mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Od 47 ispitivanih izolata 3 kvasca nisu fermentisala rafinozu i melibiozu. Svojstvo fermentacije celog molekula rafinoze i melibioze utvrđeno je kod 21 izolata. Ostali izolati sa pozitivnim testom fermentacije rafinoze razgrađivali su molekul rafinoze do melibioze, koja ostaje neusvojena u podlozi, i fruktoze koju su fermentativno usvajali.
- Na kraju pozitivnog standardizovanog testa fermentacije rafinoze odsustvo fermentabilnih šećera ili prisustvo melibioze utvrđeno je mikrobiološkom i hemijskom metodom. Isti rezultati se dobijaju mnogo brže i jednostavnije tankoslojnom hromatografijom ili tankoslojnom hromatografijom visokog učinka.
- U fermentacionim podlogama kvasaca koji fermentiraju ceo molekul rafinoze i melibioze pored njihovih konstituenata nalaze se i neidentifikovana jedinjenja sa R_f vrednostima 92, 34 i 20. Jedinjenja sa R_f vrednošću 34 i 20 nema u podlozi kod kvasaca koji fermentiraju 1/3 molekula rafinoze. U fermentacionim podlogama sa konstituentima rafinoze (glukozom, galaktozom, fruktozom i saharozom) takođe nema jedinjenja sa R_f vrednošću manjom od R_f vrednosti rafinoze.
- S obzirom da se jedinjenje sa malom retencijom ($R_f=92$) javlja u svim podlogama gde je test fermentacije pozitivan, predmet posebne pažnje u okviru ovog rada bilo je jedinjenje sa R_f vrednošću 34.
- Ispitivano jedinjenje sa R_f vrednošću 34 je intermedijer procesa fermentacije rafinoze i melibioze jer nastaje u početku fermentacije melibioze ili u početku razgradnje melibioznog dela molekula rafinoze, a na kraju fermentacije koncentracija ispitivanog jedinjenja je smanjena.
- Činioci značajni za proces fermentacije – inokulum (količina i podloge za njegovu pripremu), sastav podloge (sadržaj rafinoze i melibioze, kao i različiti izvori azota) i uslovi gajenja, varirani u odnosu na standardizovani fiziološki test fermentacije ne prouzrokuju promenu kvalitativnog sastava jedinjenja u podlozi tokom fermentacije rafinoze i melibioze. Dakle, ispitani

intermedijer je uvek prisutan u podlozi. Na povećanje sadržaja ispitivanog intermedijera u podlozi utiče dodatak galaktoze tokom fermentacije.

- Najveća koncentracija ispitivanog intermedijera javlja se trećeg dana u fermentaciji melibioze (0,87 mg/ml), odnosno drugog dana u fermentaciji rafinoze (1,48 mg/ml). Sadržaj ispitivanog intermedijera na kraju procesa fermentacije rafinoze je šest puta veći nego kod fermentacije melibioze (1,04 prema 0,17 mg/ml).
- Izolacija i prečišćavanje ispitivanog jedinjenja izvedena je klasičnim hemijskim metodama. Primenom kolonske hromatografije sa silikagelom i raznim pokretnim fazama izdvaja se do 0,25% jedinjenja u odnosu na korišćeni šećer za fermentaciju. Postupkom koji obuhvata acetilovanje delimično prečišćenog ispitivanog intermedijera, izdvajanje čistog acetilovanog intermedijera i njegovo dezacetilovanje dobija se 0,5% jedinjenja u odnosu na korišćeni šećer.
- Ispitivani intermedijer je redukujući ugljeni hidrat molekulske mase 504 što odgovara trisaharidima. Konstituenti ovog jedinjenja su glukoza i galaktoza koje su povezane najverovatnije α -tipom veze.

6. LITERATURA

1. Kreger-van Rij N.J.W. (ed.) (1984): The Yeasts. A Taxonomic Study, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
2. Kennedy J.F., White C.A. (1988): Classification and description of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides, in Carbohydrate Chemistry, J.F. Kennedy (ed.), Clarendon Press, Oxford
3. El Khadem H.S. (1988): Carbohydrate Chemistry, Monosaccharides and Their Oligomers, Ch. 6: Structure of Oligosaccharides, Academic Press, San Diego-Toronto
4. Budavari S. (ed.) (1989): Merck Index, eleventh edition, centennial edition, Merck & Co., Inc., Rahway
5. Grujić Injac B., Lajšić S. (1983): Hemija prirodnih proizvoda, Univerzitet u Nišu, Niš
6. Scheffers W.A., Wiken T.O. (1969): The Custers effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*, Antonie van Leeuwenhoek, Vol 35, Supplement: Yeast Symposium, A31
7. Barnett J.A. (1976): The Utilization of Sugars by Yeasts, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32: 125-234
8. Vrbaški Lj., Markov S. (1991): Praktikum iz mikrobiologije, Prometej, Novi Sad
9. Barnett J.A. (1981): The Utilization of Disaccharides and Some Other Sugars by Yeasts, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 39: 347-404
10. van Uden N., Windisch S. (1968): *Candida friedrichii* sp. n., a melibiose-fermenting yeast, Antonie van Leeuwenhoek 34: 270-274
11. Walt van der J.P. (1970): Criteria and Methods Used in Clasification, in The Yeasts, A Taxonomic Study, J. Lodder (ed.), North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London
12. Walt van der J.P., Yarrow D. (1984): Methods for the Isolation, Maintenance, Classification and Identification of Yeasts, in The Yeasts. A Taxonomic Study, N.J.W. Kreger-van Rij (ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
13. Ingram M. (1955): An Introduction to the Biology of Yeasts, Pitman, London
14. Lodder J. (ed.) (1970): The Yeasts. A Taxonomic Study, North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London
15. Lodder J., Khoudokormoff B., Langejan A. (1969): Melibiose - fermenting baker's yeast hybrids, Antonie van Leeuwenhoek, Vol 35, Supplement: Yeast Symposium, F9

16. Kocková-Kratohvilová A., Vojtková-Lepšíková A., Fischerová M. (1961): Die Bedeutung der Gärungstypen bei der Bestimmung der Hefen und hefeartigen Mikroorganismen, *Brauwissenschaft* 14(5/6): 210–218
17. Donkersloot, J.A. (1966): Utilization of mixtures of carbon compounds by yeasts, *Antonie van Leeuwenhoek* 32: 419–428
18. Robyt J.F., White B.J. (1987): *Biochemical Techniques. Theory and Practice*, Brooks/Cole Publ. Co., Monterey
19. Vrbaški Lj., Markov S. (1991): Proučavanje dugo čuvanih kultura pivskih kvasaca. *Fermentacija rafinoze, Nauka u praksi* 21: 365–376
20. Nord F.F., Weiss S. (1958): Fermentation and Respiration, in *The Chemistry and Biology of Yeasts*, A.H. Cook (ed.), Academic Press Inc., New York
21. Suomalainen H., Oura E. (1971): Yeast Nutrition and Solute Uptake, in *The Yeasts, Physiology and Biochemistry of Yeasts*, A.H. Rose and J.S. Harison (eds.), Academic Press, London and New York, 3–74
22. Winge Ö., Roberts C. (1958): Yeast Genetics, in *The Chemistry and Biology of Yeasts*, A.H. Cook (ed.), Academic Press Inc., New York
23. Lampen J.O. (1968): External Enzymes of Yeast: Their Nature and Formation, *Antonie van Leeuwenhoek* 34: 1–18
24. Phaff, H.J. (1963): Cell Wall of Yeasts, *Ann. Rev. Microbiol.* 17: 15–30
25. De la Fuente G., Sols A. (1962): Transport of Sugars in Yeasts. II. Mechanisms of Utilization of Disaccharides and Related Glycosides, *Biochem. Biophys. Acta* 56: 49–62
26. Friis J., Ottolenghi P. (1959): Localization of Invertase in a Strain of Yeast, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. physiol.* 31(19): 259–271
27. Cason D.T., Reid G.C., Gatner M.S. (1987): On the Differing Rates of Fructose and Glucose Utilization in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Inst. Brew.* 93(1–2): 23–25
28. Barnett J.A. (1977): The Nutritional Tests in Yeast Systematics, *J. General Microbiol.* 99: 183–190
29. Friis J., Ottolenghi P. (1959): Localization of Melibiase in a Strain of Yeast, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. physiol.* 31: 272–281
30. Watson K.G. (1987): Temperature Relations, in *The Yeasts. Yeasts and the Environment*, A.H. Rose and J.S. Harrison (eds.), vol. II, 2nd. ed., Academic Press, London–Toronto
31. Panchall C.J., Russell I., Sills A.M., Stewart G.G. (1984): Genetic Manipulation of Brewing and Related Yeast Strains, *Food Technology* 38(2): 99–106
32. Aslanidis C., Schmid K., Schmitt R. (1989): Nucleotide Sequences and Operon Structure of Plasmid-Borne Genes Mediating Uptake and Utilization of Raffinose in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 171(12): 6753–6763
33. Poolman B. (1993): Biochemistry and molecular biology of galactoside transport and metabolism in lactic acid bacteria, *Lait* 73: 87–96
34. Ryder D.S., Masschelein C.A. (1983): Aspects of metabolic regulatory systems and physiological limitations with a view to the improvement of brewing yeast performance, *EBC Monograph-IX, Symposium on Biotechnology*, Nutfield, 2–29
35. Kidby D.K., Davies R. (1970): Invertase and Disulphide Bridges in the Yeast Wall, *J. General Microbiol.* 61: 327–333

36. Oda Y., Tonomura K. (1996): α -Galactosidase from the yeast *Torulopsis delbrueckii* IFO 1255, J. Appl. Bacteriol. 80: 203–208
37. Vrbaški Lj. (1992): Mikrobiologija, Prometej, Novi Sad
38. Karlson P. (1988): Biokemija, za studente kemije i medicine, preveli P. Mildner i B. Mildner, Školska knjiga, Zagreb
39. Lodish H., Darnel J., Baltimore D. (1986): Molecular Cell Biology, Scientific American Books, New York
40. Orłowski J.H., Barford J.P. (1987): The mechanism of uptake of multiple sugars by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture under fully aerobic conditions, Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 459–463
41. Dills S.S., Apperson A., Schmidt M.R., Saier M.H.Jr. (1980): Carbohydrate Transport in Bacteria, Microbiol. Rev. 44(3): 385–418
42. Steveninck van J. (1969): The Mechanism of Transmembrane Glucose Transport in Yeast: Evidence for Phosphorylation, Associated with Transport, Arch. Biochem. Biophys. 130: 244–252
43. Cuskey S.M., Wolf J.A., Phibbs P.V.Jr., Olsen R.H. (1985): Cloning of Genes Specifying Carbohydrate Catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*, J. Bacteriol. 162(3): 865–871
44. Bisson L.F., Fraenkel D.G. (1983): Transport of 6-Deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Bacteriol. 155(3): 995–1000
45. DeJuan C., Lagunas R. (1986): Inactivation of the galactose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*, FEBS Letters 207(2): 258–261
46. Cássio, F., Leao C., van Uden N. (1987): Transport of Lactate and Other Short-Chain Monocarboxylates in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Appl. Environ. Microbiol. 53(3): 509–513
47. Lehninger A.L. (1970): Biochemistry, Worth Publishers Inc., New York
48. Lobo Z. (1984): *Saccharomyces cerevisiae* Aldolase Mutants, J. Bacteriol. 160(1): 222–226
49. Skinner C.E., Emmons C.W., Tsuchiya H.M. (1961): Henrici's Molds, Yeasts, and Actinomycetes, John Wiley & Sons Inc., London–New York
50. Hoogerheide J.C. (1971): On a disturbance of the normal Pasteur reaction in baker's yeast, Antonie van Leeuwenhoek 37(4): 435–448
51. Weusthuis R.A. (1994): Disaccharide fermentation by yeasts, proefschrift, Technische Universiteit Delft
52. Pejín D. (1974): Promene koje nastaju u ćelijama kvasca *Saccharomyces cerevisiae* kada se uzgaja na različitim koncentracijama etanola kao jedinog izvora ugljenika i uticaj acetona na taj metabolizam, doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad
53. Wiken T.O. (1968): On "Negative Pasteur Effects" in Yeasts, in Aspects of Yeast Metabolism, A.K. Mills and H. Krebs (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 133–155
54. Kew O.M., Douglas H.C. (1976): Genetic Co-Regulation of Galactose and Melibiose Utilization in *Saccharomyces*, J. Bacteriol. 125(1): 33–41
55. McKanne L., Kandel J. (1986): Microbiology. Essentials and Applications, McGraw-Hill Internat. Editions, New York–Toronto

56. Sims A.P., Barnett J.A. (1978): The Requirement of Oxygen for the Utilization of Maltose, Cellobiose and D-Galactose by Certain Anaerobically Fermenting Yeasts (Kluver Effect), *J. Gen. Microbiol.* 106: 277–288
57. Жвирблянская А.Ю., Исаева В.С. (1979): Дрожжи в пивоварении, Пищевая промышленность, Москва
58. Turakainen H., Hankaarää M., Korhola M., Aho S. (1994): Characterization of MEL Genes in the Genus *Zygosaccharomyces*, *Yeast* 10: 733–745
59. Halvorson H.O., Winderman S., Gorman J. (1963): Comparison of the α -Glucosidases of *Saccharomyces* Produced in Response to Five Non-Allelic Maltose Genes, *Biochem. Biophys. Acta* 67: 42–53
60. Stewart G.G., Erratt J., Garrison I., Goring T., Hancock I. (1979): Studies on the Utilization of Wort Carbohydrates by Brewer's Yeast Strains, *MBAA Tech. Quart.* 16(1): 1–7
61. Turakainen H., Kristo P., Korhola M. (1994): Consideration of the Evolution of the *Saccharomyces cerevisiae* MEL Gene Family on the Basis of the Nucleotide Sequences of the Genes and Their Flanking Regions, *Yeast* 10: 1559–1568
62. Turakainen H., Aho S., Korhola M. (1993): MEL Gene Polymorphism in the Genus *Saccharomyces*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8): 2622–2630
63. Sierkstra L.N., Nouwen N.P., Verbakel J.M.A., Verrips C.T. (1993): Regulation of Glycolytic Enzymes and the Crabtree Effect in Galactose-Limited Continuous Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 9: 787–795
64. Slominski B.A. (1994): Hydrolysis of Galactooligosaccharides by Commercial Preparations of α -Galactosidase and β -Fructofuranosidase: Potential for Use as Dietary Additives, *J. Sci. Food Agric.* 65: 323–330
65. Dey P.M., Pridham J.B. (1971): Biochemistry of α -galactosidases, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 36: 91–130
66. Marbach I., Mayer A.M., Maron R. (1978): Galactosidases in Cultivated and Wild Peas, *Pytochemistry* 17: 655–657
67. Suzuki H., Su-Chen L., Yu-Teh L. (1970): α -Galactosidase from *Mortierella vinacea*, *J. Biol. Chem.* 245(4): 781–786
68. Cartledge T.G., Lloyd D. (1972): Subcellular Fractionation of Particles containing Acid Hydrolases from *Saccharomyces carlsbergensis*, *Biochem. J.* 126: 755–757
69. Takayanagi T., Kushida K., Idonuma K., Ajisaka K. (1992): Novel N-linked oligo-mannose type oligosaccharides containing an α -D-galactofuranosyl linkage found in α -D-galactosidase from *Aspergillus niger*, *Glucoconjugate Journal* 9: 229–234
70. Takayanagi T., Kimura A., Chiba S., Ajisaka K. (1994): Novel N-linked oligo-mannose type oligosaccharides containing α -D-galactofuranosyl linkages in *Aspergillus niger* α -D-glucosidase, *Carbohydr. Res.* 256: 149–158
71. Blanshard P.H., Albon N. (1950): , *Arch. Biochem.* 29: 220–
72. Hashimoto H., Katayama C., Goto M., Okinaga T., Kitahata S. (1995): Enzymatic Synthesis of α -Linked Galactooligosaccharides Using the Reverse Reaction of a Cell-bound α -Galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(2): 179–183

73. Hashimoto H., Katayama C., Goto M., Okinaga T. Kitahata S. (1995): Transgalactosylation Catalyzed by α -Galactosidase from *Candida guilliermondii* H-404, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59(4): 619–623
74. Monsan P., Paul F., Remaud M., Lopez A. (1989): Novel Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides, *Food Biotechnol.* 3(1): 11–29
75. Clancy M.J., Whelan W.J. (1967): Enzymic Polymerization of Monosaccharides, I. The Enzymic Polymerization of D-galactose, *Arch. Biochem. Biophys.* 118: 724–729
76. Scheda R., Yarrow D. (1966): The Instability of Physiological Properties Used as Criteria tne the Taxonomy of Yeasts, *Arch. Microbiol.* 55: 209–225
77. Scheda R., Yarrow D. (1968): Variation in the Fermentation Patern of Some *Saccharomyces* species, *Arch. Microbiol.* 61: 310–316
78. Gilliland R.B. (1971): Yeast classification, *J. Inst. Brew.* 77: 276–284
79. Walt van der J.P. (1970): Genus *Saccharomyces*, in *The Yeasts, A Taxonomic Study*, J. Lodder (ed.), North-Holland Publishing Co., Amsterdam–London
80. Yarrow D. (1984): Genus *Saccharomyces*, in *The Yeasts. A Taxonomic Study*, N.J.W. Kreger-van Rij (eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
81. Kreger-van Rij N.J.W., Kurtzman C.P. (1984): Classification of the ascosporeogenous yeasts, in *The Yeasts. A Taxonomic Study*, N.J.W. Kreger-van Rij (ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam
82. Vancanneyt M., Pot B., Hennebert G., Kersters K. (1991): Differentiation of Yeast Species Based on Electrophoretic Whole-Cell Protein Patterns, *System. Appl. Microbiol.* 14: 23–32
83. Campbell I. (1971): Numerical Taxonomy of Various Genera of Yeasts, *J. General Microbiol.* 67: 223–231
84. Gasent-Ramirez J.M., Codon A.C., Benitez T. (1995): Characterization of Genetically Transformed *Saccharomyces cerevisiae* Baker's Yeasts Able To Metabolize Melibiose, *Appl. Environ. Microbiol.* 61(6): 2113–2121
85. Wettstein von D. (1987): Molecular genetics in the Improvement of Brewer's and Distiller's Yeast, *Antonie van Leeuwenhoek* 53(5): 299–305
86. Hough J.S., Briggs D.E., Stevens R. (1976): Naučni aspekti sladarstva i pivarstva, prevod S. Gaćeša, Poslovno udruženje industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd
87. Naumov G., Naumova E., Turakainen H., Korhola M. (1996): Identification of the α -galactosidase MEL genes in some populations of *Saccharomyces cerevisiae*: a new gene MEL11, *Genet. Res. Camb.* 67: 101–108
88. Zhu A., Monahan C., Zhang Z., Hurst R., Leng L., Goldstein J. (1995): High-Level Expression and Purification of Coffee Bean α -Galactosidase Produced in the Yeast *Pichia pastoris*, *Arch. Biochem. Biophys.* 324(1): 65–70
89. Difco Manual (1984): Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, Difco Laboratories, Detroit
90. Donhauser S., Wagner D., Guggeis H. (1987): Hefestämme und Bierqualität, *Brauwelt* 127 (29): 1273–1280
91. Donhauser S., Wagner D., Gordon H. (1987): Hefestämme und Bierqualität, *Brauwelt* 127 (38): 1654–1664

92. Vrbaški Lj., Lepojević Ž. (1991): Rapid identification of microbial starch degradation products from a complex nutrient medium by HPTLC method, *J. Chromat.* 558 (1): 328–332
93. Vrbaški Lj., Jokić Lj., Markov S. (1993): The Investigation of Brewing Yeasts. IV. Morphological and Physiological Characteristics of Strains from Culture Collection under Simulated Production Conditions, *J. Sci. Agric. Research* 54 (1–4): 81–90
94. Vrbaški Lj., Markov S., Jokić Lj. (1991): Karakteristike nekih proizvodnih sojeva kvasaca iz vojvođanskih pivara, *Pivarstvo* 24 (2): 59–64
95. Vrbaški Lj., Markov S. (1991): Ispitivanje pivskih kvasaca. III. Zastupljenost respiratorno deficijentnih mutanata među kvascima iz tekuće proizvodnje vojvođanskih pivara i muzejskih kultura, *Zbornik radova br. 22*: 103–107, Tehnološki fakultet, Novi Sad
96. Vrbaški Lj., Markov S., Lepojević Ž. (1995): Praćenje fermentacije nekih šećera HPTLC metodom, *Zbornik rezimea, VII Kongres mikrobiologa Jugoslavije*, 12–16.06. Herceg Novi, str. 42
97. Vrbaški Lj., Markov S., Jakovljević J., Lepojević Ž. (1992): Improved thin-layer chromatography separation of carbohydrates in wort and beer, *Biotechnol. Tech.* 6(5): 413–416
98. Кудрявцев В.И. (1954): Систематика дрожжей, Издательство Академии Наук СССР, Москва
99. Kocková-Kratochvilová A. (1976): Taxometric Study of the Genus *Saccharomyces* /Meyen/ Reess. 3rd part: Small Species, *Treatises on Biology XXII/6*, Vydateľ'stvo Slovenskej Akadémie Vied, Bratislava
100. Vrbaški Lj. (1976): Uticaj subletalnih doza formaldehida na neke sojeve industrijskih kvasaca, doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
101. Vrbaški Lj., Hauk M. (1988): Biološke karakteristike pivarskih kvasaca iz vojvođanskih pivara, *Pivarstvo* 19(3–4): 123–126
102. Branković D. (1987): Prilog proučavanju mikrobioloških aspekata prečišćavanja otpadnih voda iz fabrike alkohola, magistarski rad, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
103. Panchal C.J., Stewart G.G. (1980): The Effect of Osmotic Pressure on the Production and Excretion of Ethanol and Glycerol by a Brewing Yeast Strain, *J. Inst. Brew.* 86(9–10): 207–210
104. Грачева И.М., Бартенев, Н.С., Визельман, Б.Б. (1973): Влияние величины засева на накопление биомассы дрожжей *Sacch. carlsbergensis* шт. XI, длительность брожения и образование высших спиртов, *Прикладная биохимия и микробиология IX(5)*: 653–658
105. Берри Д. (1985): Биология дрожжей, перевод В.Г. Горбулева, Мир, Москва
106. Šilháková L. (1985): Yeast Mutants excreting Vitamin B₁ and their Use in the Production Thiamine Rich Beers, *J. Inst. Brew.* 91: 78–81
107. Harrison J.S., Graham, J.C.J. (1970): Yeasts in Distillery Practice, in *The Yeasts, Yeast Technology*, A.H. Rose and J.S. Harrison (eds), vol. 3, Academic Press, London–New York

108. Dhawale M.R., Szarek W.A., Hay G.W., Kropinski A.M.B. (1986): Preparation of L-fructose and D-sorbose by the bacterial oxidation of L-mannitol and L-glucitol, respectively, *Carbohydr. Res.* 155: 262-265
109. Havlicek J., Samuelson O. (1975): Partition Chromatography of Sugars in Wort and Beer on Anion Exchange Resins, *J. Inst. Brew.* 81: 466-470
110. Nikolov Ž.L., Jakovljević J.B., Boškov Ž.M. (1984): High Performance Liquid Chromatographic Separation of Oligosaccharides Using Amine Modified Silica Columns, *Starch/Stärke* 36(3): 97-100
111. Zweig G., Sherma J. (eds.) (1972): *Handbook of Chromatography*, vol. 2, CRC Press, Cleveland
112. Sols A., Gancedo C., DelaFuente G. (1971): Energy-Yielding Metabolism in Yeasts, in *The Yeasts. Physiology and Biochemistry of Yeasts*, A.H. Rose and J.S. Harrison (eds.), vol 2., Academic Press, London-New York
113. Thomas C.M., Ford-Lloyd B., Lyddiatt A. (1995): Glycobiology – One key to biological specificity, *Biotechnol. News* 33: 1-2
114. Stojanović O., Stojanović N. (1979): *Hemija ugljenih hidrata*, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd
115. Wallenfels, K., Malhotra O.P. (1961): Galactosidases, *Adv. Carbohydr. Chem.* 15: 239-299
116. French D. (1954): The Raffinose Family of Oligosaccharides, *Adv. Carbohydr. Chem.* 9: 149-186

