

GEBRUIK VAN MELKZUURBACTERIËN VOOR DE ONTWIKKELING VAN INNOVATIEVE (LAAG-ALCOHOLISCHE) BIEREN

Sander Wittouck

Stamnummer: 01407721

Promotor(en): Prof. Dr. ir. Jessika De Clippeleer, Dr. ir. David Laureys

Tutor: Dr. ir. David Laureys

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Academiejaar: 2019 - 2020

GEBRUIK VAN MELKZUURBACTERIËN VOOR DE ONTWIKKELING VAN INNOVATIEVE (LAAG-ALCOHOLISCHE) BIEREN

Sander Wittouck

Stamnummer: 01407721

Promotor(en): Prof. Dr. ir. Jessika De Clippeleer, Dr. ir. David Laureys

Tutor: Dr. ir. David Laureys

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad in Master of Science in de industriële wetenschappen: biochemie

Academiejaar: 2019 - 2020

Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.
Universiteitsbibliotheek Gent, 2021.

This page is not available because it contains personal information.
Ghent University, Library, 2021.

Voorwoord

Deze masterproef is het afsluitende werk van mijn universitaire opleiding. Hiermee wil ik mijn studie betekenisvol afsluiten door een bijdrage te leveren aan de wetenschap. Ik heb dit onderwerp gekozen door mijn passie voor bier. Hierbij zijn het vooral de speciaalbieren die mij het meeste aanspreken door de grote variatie die er de dag van vandaag is. Daarnaast ben ik mij ook bewust van de gevolgen van alcohol, voornamelijk in het verkeer. Het aanbod in smaakvolle laag- of non-alcoholische bieren blijft de dag van vandaag, voor mij persoonlijk, beperkt. Toen ik dus dit masterproefonderwerp zag, was ik dan ook direct enthousiast om hieraan mee te werken.

Jammer genoeg viel deze masterproef in een uitzonderlijk academiejaar (2019-2020), waarin de wereld werd geconfronteerd met de gevolgen van de Covid-19 crisis. Deze crisis heeft hier dan ook een invloed op gehad door het praktische werk in het labo vroegtijdig te stoppen. Ik beschouw deze masterproef dan ook als een drukke en stressvolle periode, maar ook zeker en vast leerrijk. Leerrijk op vlak van wetenschap en meer specifiek het brouwproces, maar ook over het omgaan met stress in uitzonderlijke tijden.

Graag wil ik van de gelegenheid gebruik maken om een aantal mensen te bedanken.

Mijn promotor Dr. ir. David Laureys, voor de begeleiding in uitzonderlijke en drukke tijden. Prof. Dr. ir. Jessika De Clippeleer, voor de mogelijkheid om mijn masterproef uit te voeren binnen haar vakgroep. Célestine De Baets, voor de vlotte samenwerking tijdens het eerste semester. Chris Willems, Dr. Anneleen Wieme en Jindrich Peiren voor de hulp bij de identificatie van de melkzuurbacteriën via MALDI-TOF-MS. Alle medewerkers van het labo brouwerijtechnologie en de andere masterproefstudenten, voor de hulp bij algemene vragen, uitleg van toestellen, maar ook voor een gewone babbel tijdens het werk. Mijn vrienden, voor hun luisterend oor en hun steun tijdens de stresserende en moeilijke momenten.

Tot slot wil ik ook mijn ouders bedanken, voor de mogelijkheid om altijd te mogen studeren wat ik wou. En voor hun onvoorwaardelijke steun en begrip, die ze mij tijdens deze studies geboden hebben.

Voor u ligt mijn masterproef, een resultaat van een jaar werk. Ik hoop dat het u mag bekoren.

Sander Wittouck

Corona

Omwille van de Coronacrisis kon een groot deel van het praktische werk niet afgerond worden zoals gepland. Voor deze thesis werden melkzuurbacteriën uit zuurdesems en starterculturen opgezuiverd, waarna deze geïdentificeerd werden via MALDI-TOF-MS. Nadien zou de tolerantie van deze melkzuurbacteriën nagegaan worden tegen ethanol, α -zuren en iso- α -zuren. Op basis van deze resultaten zou een selectie gemaakt kunnen worden van 3-4 melkzuurbacteriën om hun implementatie in het brouwproces in meer detail te onderzoeken. Hierbij zou nagegaan worden of de fermentatie door gist en MZB tegelijk kan doorgaan (parallel) of dat het beter is om eerst de fermentatie door MZB of gist uit te voeren, gevolgd door een tweede fermentatie door gist of MZB (sequentieel).

Op het moment dat de universiteit werd gesloten voor de masterstudenten, werd de tolerantie van de melkzuurbacteriën tegen ethanol onderzocht. Daarnaast waren ook testen opgestart voor de extractie uit te voeren van α -zuren uit hop pellets en het bepalen van de concentratie α -zuren in het extract.

In overleg met de promotor werd beslist om de literatuurstudie uit te breiden en een extra hoofdstuk rond geplande experimenten op te stellen. Voor dit laatste werden protocollen en experimentele set-ups in detail beschreven en geëvalueerd op basis van eerdere experimenten en protocollen uit de literatuur.

Abstract (Nederlands)

De bierconsumptie daalt wereldwijd, te wijten aan de bewustwording van de gevolgen van alcohol. Consumenten kiezen dan ook meer en meer kiezen voor speciaalbieren en alternatieve laag-alcoholische dranken. Deze masterproef beoogt om een alternatief (laag-alcoholisch) bier te produceren met een lichtzure toets, afkomstig van melkzuur dat geproduceerd wordt door melkzuurbacteriën. Deze bacteriën zijn soms aanwezig in het productieproces van bier, maar dan eerder bij de spontane (ongecontroleerde) fermentatie, wat kan leiden tot variatie in het eindproduct. Het onderzoek is dan ook gefocust op de gecontroleerde implementatie van melkzuurbacteriën in het bierproductieproces. Hiervoor werden melkzuurbacteriën opgezuiverd uit zuurdesems en bestaande commerciële starterculturen, waarna identificatie volgde via *matrix-assisted-laser-desorption-ionisation, time-of-flight mass-spectrometry*. De bekomen species waren: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* en *Lactococcus lactis*.

Om de tolerantie van deze isolaten tegen ethanol, α -zuren en iso- α -zuren in meer detail te bestuderen, werd een methode opgesteld waarbij fermentaties uitgevoerd konden worden in 96-well platen. Hievoor werden, bij een eerste test, *Lactobacillus brevis* en *Lactococcus lactis* reeds gecultiveerd in 16 verschillende concentraties ethanol. Er werden verschillen waargenomen in groei maar er werd ook ondervonden dat de aanwezige ethanol verdampte, waardoor het experimentele design aangepast diende te worden. Het experiment kon echter niet meer opnieuw uitgevoerd worden.

Om de tolerantie tegen α -zuren na te gaan, werden testen gestart om een waterig extract aan te maken uit hop pellets. Dit extract zou dan geïsommeriseerd kunnen worden door verhitting. Om het antimicrobieel effect van de α -zuren en iso- α -zuren te kunnen vergelijken, werd een gelijkaardige tolerantietest zoals bij ethanol bedacht. Uit deze resultaten zouden de meest geschikte melkzuurbacteriën geselecteerd worden voor implementatie in het productieproces van bier. Om dit te onderzoeken werd een experiment opgesteld om na te gaan of de fermentatie door MZB en gist parallel of sequentieel kan doorgaan en waarbij de invloed van de concentratie van de inocula werd nagegaan op het finale bier. Ten slotte werd ook een experiment bedacht om na te gaan hoe de melkzuurfermentatie kon gestopt worden om een stabiel eindproduct te bekomen.

Melkzuurbacteriën, MALDI-TOF-MS, fermentatie, bier

Abstract (English)

De global consumption of beer decreases, due to the consequences of alcohol. This causes people to choose more and more for alternative beers and other (low-alcoholic) beverages. This thesis focusses on the production of an alternative (low-alcoholic) beer with a light sour taste, produced by the lactic acid of lactic acid bacteria. These bacteria already are used in the brewing process within the spontaneous (uncontrolled) fermentations. The problem with these kinds of fermentations is the variety of the end product. This research tries to implement the lactic acid bacteria in the beer production process under controlled conditions. Lactic acid bacteria were isolated out of sourdough and commercial freeze-dried cultures. The species were identified by matrix-assisted-laser-desorption-ionisation, time-of-flight mass-spectrometry and gave following results: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Lactococcus lactis*.

The identified bacteria were tested for their tolerance against ethanol, α -acids and iso- α -acids, by following fermentations that happened in a 96-well plate. These plates contained wort with different concentrations of ethanol, α -acids or iso- α -acids. A first test was executed by cultivating *Lactobacillus brevis* and *Lactococcus lactis* in 16 different concentrations of ethanol. Analyzing these results, differences in growth were observed, but also was seen that the ethanol had evaporated. The experimental design was adjusted but could not be executed again.

To test the tolerance against α -acids, an extraction of this compound out of hop pellets was executed but could not be further analyzed. This extract could be heated so the α -acids are converted to iso- α -acids. These two extracts could be used in an experiment, so the antimicrobial effect of both could be compared. The suitable isolates could be selected and tested for their interaction with yeast (parallel or sequential fermentation). During this experiment, the influence of the concentration of the inocula on the final beer could also be observed. Finally, an experiment was designed to look how the lactic acid fermentation could be stopped.

Lactic acid bacteria, MALDI-TOF-MS, fermentation, beer

Inhoudsopgave

Auteursrecht	I
Voorwoord.....	II
Corona.....	III
Abstract (Nederlands).....	IV
Abstract (English)	V
Afkortingen.....	3
Figurenlijst	4
Tabellenlijst	6
Literatuurstudie	7
1. <i>Introductie</i>	7
2. <i>Geschiedenis van bier</i>	8
3. <i>Bierproductie</i>	10
3.1. Mouten	10
3.2. Brouwen.....	12
3.3. Fermenteren	18
4. <i>Gisten</i>	18
4.1. Metabolisme.....	19
4.2. Flocculatie.....	21
5. <i>Melkzuurbacteriën.....</i>	21
5.1. Metabolisme.....	22
5.2. Alternatieve pyruvaat pathway	23
5.3. Exopolysacchariden	26
6. <i>Flavour</i>	28
6.1. Gisten.....	28
6.2. Melkzuurbacteriën	31
Doelstelling.....	36
Materiaal en methoden	37
1. <i>Opzuivering van isolaten uit zuurdesems</i>	37
2. <i>Opzuivering van isolaten uit starterculturen.....</i>	37
3. <i>Karakterisatie melkzuurbacteriën</i>	38
3.1. Gram positief of negatief.....	38
3.2. Aanwezigheid van katalase.....	38
3.3. Productie van exopolysacchariden.....	38
3.4. CO ₂ -productie	38

4.	<i>Identificatie van isolaten via MALDI-TOF MS</i>	38
4.1.	Principe	38
4.2.	Methode	40
4.3.	Interpretatie van de resultaten	40
5.	<i>Groei van melkzuurbacteriën en/of gist in wort</i>	40
6.	<i>Groei van melkzuurbacteriën in wort</i>	41
7.	<i>Groei van melkzuurbacteriën in wort met verschillende ethanolconcentraties</i>	41
8.	<i>Ethanol-, dichtheits- en pH-bepaling</i>	42
9.	<i>pH-bepaling</i>	42
10.	<i>OD600 via spectrofotometrie</i>	42
Resultaten en discussie		43
1.	<i>Karakterisatie melkzuurbacteriën</i>	43
2.	<i>Identificatie van isolaten via MALDI-TOF MS</i>	43
3.	<i>Groei van melkzuurbacteriën en/of gist in wort</i>	45
4.	<i>Groei van melkzuurbacteriën in wort</i>	46
5.	<i>Groei van melkzuurbacteriën in wort met verschillende ethanolconcentraties</i>	47
Geplande experimenten		51
1.	<i>Groei van melkzuurbacteriën in wort met verschillende ethanolconcentraties</i>	51
2.	<i>Extractie van α-zuren en iso-α-zuren uit hoppellets</i>	53
3.	<i>Groei van melkzuurbacteriën in wort met verschillende concentraties α-zuren en iso-α-zuren</i>	54
4.	<i>Adaptatie van melkzuurbacteriën tegen ethanol, α-zuren en iso-α-zuren</i>	55
5.	<i>Interactie tussen melkzuurbacteriën en gist bij wortfermentatie</i>	55
6.	<i>Stoppen van het fermentatieproces</i>	56
Algemeen besluit		58
Referenties		59
Bijlagen		67

Afkortingen

ALE = *adaptive laboratory evolution*

BA = biogene amines

BC = *before Christ*

HePS = heteropolysacchariden

HoPS = homopolysacchariden

M.o. = micro organismen

MRS = De Man, Rogosa en Sharpe

MZB = melkzuurbacteriën

ORF = *open reading frame*

PCR = *polymerase chain reaction*

YPD = *yeast extract peptone dextrose*

Figurenlijst

Figuur 1: De groei van de omzet van alcoholische en alcoholvrije bieren (Abboud, 2019).....	7
Figuur 2: Schematische voorstelling van het mout- en brouwproces (Palm, 2019).	11
Figuur 3: Schematisch overzicht van het moutproces (Malteurop).....	11
Figuur 4: Schematische voorstelling van een gerstkorrel voor kieming (links) en tijdens/na kieming (rechts) (Aerts).....	12
Figuur 5: Inwerking van α -amylase (boven) en β -amylase (onder) op amylose met de vorming van maltose en malto-oligosacchariden (Aerts).....	13
Figuur 6: β -amylase inwerking op zetmeel met vorming van maltose en hoog-moleculaire dextrinen (Aerts).....	13
Figuur 7: (links) schematisch overzicht van endospermcel in gerst; (rechts) schematische weergave van de werktemperaturen voor de verschillende enzymen tijdens het brouwproces (Aerts).	14
Figuur 8: Schematische voorstelling van een hopbel (Olsovska et al., 2016).	15
Figuur 9: Invloed iso- α -zuren op Gram positieve bacteriën (links) en de mogelijke resistentiemechanismen (rechts) (Bokulich & Bamforth, 2013).	16
Figuur 10: Twee strategieën voor de vorming van alcohol-tolerante bacteriën: adaptive laboratory evolution (ALE) en global transcription machinery engineering (gTME) (Horinouchi et al., 2018).....	17
Figuur 11: Schematische voorstelling van de asexuele en seksuele cyclus van gisten: 1. Knopvorming, 2. fusie van twee haploïde cellen, 3. Sporenvorming (Usher, 2019).	18
Figuur 12: Schematische voorstelling van de opname van suikers door gistcellen (Stewart et al., 2013).	19
Figuur 13: Alcoholische fermentatie - enzymatische stappen bij <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Faria-Oliveira et al., 2013).	20
Figuur 14: Aerobe respiratie in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Faria-Oliveira et al., 2013).	21
Figuur 15: Schematische overzicht van flocculatie, waarbij lectine bindt aan de celwand van naburige cellen via phosphomannan (Verstrepen, Derdelinckx, Verachtert, et al., 2003).	21
Figuur 16: Homofermentatieve metabolisme van MZB. 1 en 2 fosfoenolpyruvaat (PEP)-afhankelijk suiker fosfotransferase systeem (PTS); 3 mannitol-specifiek PTS; 4 fosfoglucoose isomerase; 5 mannitol-1-fosfaat dehydrogenase; 6 mannitol 1-fosfatase; 7 6-fosfofructokinase; 8 fructose-difosfatase; 9 fructose 1,6-difosfaat aldolase; 10 triosefosfaat isomerase; 11 glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase en fosfoglyceraat kinase; 12 fosfoglyceromutase en enolase; 13 pyruvaat kinase; 14 lactaat dehydrogenase; 15 pyruvaat-formaat lyase; 16 acetaldehyde dehydrogenase en alcohol dehydrogenase; 17 pyruvaat dehydrogenase; 18 acetaat kinase; 19 α -acetolactaat synthase; 20 α -acetolactaat decarboxylase; 21 2,3-butaandiol dehydrogenase (Wisselink et al., 2002).	24
Figuur 17: Heterofermentatieve metabolisme van MZB. 1 en 2 glucose en fructose permease; 3 glucokinase; 4 glucose-6-fosfaat dehydrogenase; 5 6-fosfogluconaat dehydrogenase; 6 epimerase; 7 fosfoketolase; 8 glucose fosfaat isomerase; 9 fructokinase; 10 mannitol dehydrogenase; 11 glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase en fosfoglyceraat kinase; 12 fosfoglyceromutase en enolase; 13 pyruvaat kinase; 14 lactaat dehydrogenase; 15 fosfaat acetyltransferase; 16 acetaldehyde dehydrogenase en alcohol dehydrogenase; 17 acetaat kinase (Wisselink et al., 2002).	25
Figuur 18: Schematisch overzicht voor de alternatieve verwerking van pyruvaat tot andere eindproducten. De stippellijnen stellen een niet-enzymatische reactie voor. 1 diacetylsynthase; 2. Acetolactaat synthase; 3. Pyruvaat-formaat lyase; 4. Pyruvaat dehydrogenase; 5. Pyruvaat oxidase; 6. Acetaat kinase (Axelsson, 2004).	26
Figuur 19: Omzetting van sucrose tot de homopolysacchariden glucaan of fructaan (Monsan et al., 2001).....	27
Figuur 20: structuren van fructanen met bovenaan levan en onderaan inuline (Monsan et al., 2001).	27
Figuur 21: Schematische opdeling van de term flavour.	28
Figuur 22: Vorming van diacetyl en 2,3-pentaandion (Mosher & Trantham, 2017).	29
Figuur 23: Schematische weergave voor de vorming van de verschillende hoofdgroepen van flavour actieve componenten in bier, gevormd door gisten (Brányik et al., 2008).	30
Figuur 24: Diacetyl biosynthese in <i>Lactococcus lactis</i> . ALDB, α -acetolactaat decarboxylase; ALS, α -acetolactaat synthase; ILVNB, acetohydroxyzuur synthase (Mazzoli et al., 2014).	33

Figuur 25: Algemeen overzicht van de proteolyse van MZB die leidt tot verschillende flavourcomponenten (G. Smit et al., 2005).	34
Figuur 26: Schematische voorstelling van matrix-assisted-laser-desorption-ionisation (Jindrich, 2019).	39
Figuur 27: Grafische voorstelling van de uitplating op MRS (linksboven) en YPD (rechtsboven); Alcohol- (linksonder) en pH-evolutie (rechtsonder) van de fermentaties van wort (75 g/l gedroogd wortextract) door een melkzuurbacterie (<i>Lactobacillus brevis</i>) en/of gist (<i>SafAle T-58</i>). Negatieve controle bestond uit 100 µl steriele saline (● = controle, ● = melkzuurbacterie, ● = melkzuurbacterie + gist, ● = gist)	46
Figuur 28: Opvolging van de pH gedurende de fermentatie door <i>Lactobacillus brevis</i> (1D2), <i>Lactobacillus brevis</i> (1P4-a), <i>Pediococcus pentosaceus</i> (1T2), <i>Lactobacillus plantarum</i> (1T6-a), <i>Pediococcus pentosaceus</i> (2 Gerst B5C), <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (FD-a), <i>Lactococcus lactis</i> (LK-a) en <i>Lactobacillus plantarum</i> (VM-a) in wort (75 g/l wortextract). De negatieve controle bestond uit 100 µl van de 0,9% saline-oplossing die aan het medium werd toegevoegd (● = 1D2, ● = 1P4-a, ● = 1T2, ● = 1T6-a, ● = 2 Gerst B5C, ● = FB-a, ● = LK-a, ● = VM-a, ● = controle).	47
Figuur 29: Invloed van de ethanolconcentratie op de groei van LKa (<i>Lactococcus lactis</i>) in wort (75 g/l wortextract) (● = 0,00% ● = 0,50%, ● = 1,00%, ● = 1,50%, ● = 2,00%, ● = 2,50%, ● = 3,00%, ● = 3,50%, ● = 4,00%, ● = 4,50%, ● = 5,00%, ● = 5,50%, ● = 6,00%, ● = 6,50%, ● = 7,00% en ● = 7,50%).	49
Figuur 30: Invloed van de ethanolconcentratie op de groei van 1D2 (<i>Lactobacillus brevis</i>) in wort (75 g/l wortextract) (● = 0,00% ● = 0,50%, ● = 1,00%, ● = 1,50%, ● = 2,00%, ● = 2,50%, ● = 3,00%, ● = 3,50%, ● = 4,00%, ● = 4,50%, ● = 5,00%, ● = 5,50%, ● = 6,00%, ● = 6,50%, ● = 7,00% en ● = 7,50%).	50
Figuur 31: Schematisch overzicht van de verdere strategie voor de geplande experimenten.	51

Tabellenlijst

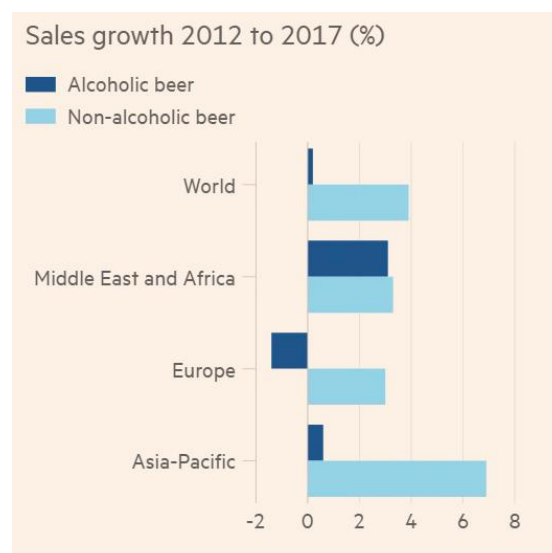
Tabel 1: Aangekochte starterculturen met de te verwachten micro organismen.	37
Tabel 2: Samenstelling van de media om de tolerantie van melkzuurbacteriën tegen ethanol na te gaan. Wort (75g/l wortextract) bevatte ethanolconcentraties (uitgedrukt in %v/v).	42
Tabel 3: Identificatieresultaten van de isolaten, opgezuiverd uit de zuurdesems en de starterculturen, via MALDI-TOF MS. De exacte Brucker microflex™ scores, per isolaat, zijn te vinden in de bijlage (- = negatief, + = positief).	44
Tabel 4: Aan te maken verdunningsreeks met verschillende ethanolconcentraties.	52
Tabel 5: Aan te maken reeks in de 96-well plaat voor de fermentatieproef.	52
Tabel 6: Opmaak van de melkzuur-ijklijn vanuit een 15g/l stockoplossing voor de bepaling van melkzuurconcentratie via spectrofotometrie.	53
Tabel 7: Resultaten analyse door AntonPaar AlcoLyzer beer analyzing-toestel voor de groei en fermentatie van een melkzuurbacterie (<i>Lactobacillus brevis</i>) en/of gist (<i>Fermentis SafAle T-58</i>) in wort (75 g/l wortextract). De negatieve controle bestond uit innoculatie van het wort met 100 µl van de 0,9% saline-oplossing.	67

Literatuurstudie

1. Introductie

Tegenwoordig is er een tendens te zien van het globale alcoholgebruik, waarbij meer en meer alcoholvrije dranken worden geconsumeerd (Abboud, 2019). Dit heeft verschillende oorzaken zoals verhoogde alcoholcontroles, verhoogde belastingen op alcohol, maar ook de bewustwording van de gevolgen van alcohol (Chaloupka, Grossman, & Saffer, 2002; Thakker, 1998). Zo zijn mensen meer bezorgd over de gevolgen van alcoholconsumptie voor hun gezondheid. Volgens *Financial Times* is er een algemene daling te zien in het alcoholgebruik bij de Britten. Zo zou 25% van de 16-24 jarigen geen alcohol consumeren, dit is een stijging van 6% ten opzichte van 2005 (Abboud, 2019). Deze stijging is nog groter bij de categorie 25-44 jarigen. In België is er ook een daling in het alcoholgebruik te zien van 15% ten opzichte van 2005 (Druglijn). Specifiek voor bier bedraagt deze daling zelfs 24%.

Deze trend zet de deur open voor de productie en consumptie van alcoholvrije bieren. De verkoop van laag- en niet-alcoholische bieren is de laatste vijf jaar gestegen met 18% in West-Europa (Abboud, 2019). Deze tendens is ook te zien in de andere werelddelen (figuur 1). Toch blijkt nog vaak uit bevestigingen dat deze alcoholvrije bieren niet voldoen aan de verwachtingen van de consument en meer een tweede keus zijn bij gebrek aan een alternatief, voornamelijk voor automobilisten en zwangere vrouwen.



Figuur 1: De groei van de omzet van alcoholische en alcoholvrije bieren (Abboud, 2019).

Binnen deze masterproef wordt gezocht naar de ontwikkeling van een nieuw, innovatief (laag-alcoholisch) bier door gebruik te maken van gisten en melkzuurbacteriën. Er wordt gekeken hoe melkzuurbacteriën kunnen worden gebruikt in het brouwproces en hoe de productie van melkzuur, onder gecontroleerde omstandigheden, een invloed kan hebben op het finale bier.

Bier is een gefermenteerde drank, waarbij fermentatie een spontaan of bewust geïnitieerd proces is, die de neiging heeft traag door te gaan en variërende eindproducten te geven (Hutkins, 2008). Vroeger werd fermentatie gezien als een techniek voor het verhogen van de bewaarbaarheid van levensmiddelen, maar door nieuw ontwikkelde technieken (invriezen, steriliseren, pasteuriseren, ...) is dit niet meer nodig. Fermentatie heeft momenteel dan ook vooral de functie om het voedingsgehalte van grondstoffen te verbeteren en de organoleptische eigenschappen te verbeteren. Dit komt doordat vezels en eiwitten beter worden vrijgesteld en verteerd kunnen worden, wat vaak resulteert in de synthese van vitaminen, essentiële

aminozuren en eiwitten. Naast het verbeteren van de voedingswaarde zal een fermentatieproces ook de voedselveiligheid ten goede komen, doordat toxische componenten zoals aflatoxines en cyanogenen worden geneutraliseerd. Daarnaast worden vaak nog altijd anti-microbiële factoren zoals melkzuur, koolzuurgas, waterstofperoxide en ethanol gevormd, waardoor het ontstane product langer bewaard kan blijven. (Giraffa, 2004; Hutkins, 2008).

Het fermentatieproces wordt uitgevoerd door micro-organismen (m.o.). De meest gebruikte m.o. voor levensmiddelenfermentaties zijn melkzuurbacteriën, gisten en schimmels. Om het proces onder controle te krijgen, is het dan ook belangrijk om deze m.o. te bestuderen. Kennis omtrent hun fysiologie, metabolisme en genetische eigenschappen is uiterst belangrijk (Giraffa, 2004). Deze m.o. produceren elk verschillende componenten, die een bepaalde flavour aan het bier zullen toevoegen. Deze flavourcomponenten kunnen gewenst of ongewenst (off-flavour) zijn.

2. Geschiedenis van bier

Wanneer de geschiedenis van bier bekeken wordt, zijn er veel verschillende alcoholische dranken afkomstig van een breed spectrum grondstoffen (fruit, honing, gerst, graan, ...) die bier genoemd worden (Nelson, 2003). Er kan echter geconcludeerd worden dat sommige van deze dranken eerder als wijn of gedistilleerde dranken dienen bestempeld te worden. Deze dranken konden over de hele wereld gevonden worden, waardoor het niet duidelijk is waar het brouwproces van bier (zoals dit momenteel gekend is) is ontdekt.

Ieder graanproduct dat suikers bevat kan spontaan beginnen fermenteren door de van nature aanwezige gisten. Het is mogelijk dat bier-achtige dranken zijn ontstaan doordat een bepaalde cultuur graanproducten gebruikte. Chemische testen op oude potten, die gevonden zijn in het hedendaagse Iran en China, tonen aan dat vanaf 7000 B.C. al bier werd gebrouwen (Wang et al., 2016). Zij brouwden bieren o.b.v. een mengsel van rijst, honing en fruit. De rijst, gebruikt bij dit proces, was hoogst waarschijnlijk eerst gekiemd voor het brouwen. Dit om de vrijstelling en omzetting van zetmeel tot suikers te bevorderen (Mosher & Trantham, 2017).

Door de vruchtbare grond in Noord-Afrika en Mesopotamië, nam de graanproductie toe omstreeks 6000 B.C. (Willaert, 2007). Het is dan ook hier dat het brouwproces waarschijnlijk verder werd ontwikkeld. De bieren die toen werden gemaakt, verschillen van de bieren die de dag van vandaag gemaakt worden. Volgens het koninklijk besluit van 31 maart 1993 is bier: de drank verkregen na alcoholische gisting van een wort hoofdzakelijk bereid uit zetmeel- en suikerhoudende grondstoffen, waarvan tenminste 60% gerst-of tarwemout is, alsmede hop, eventueel in verwerkte vorm, en brouwwater. Het bier rond 6000 B.C. kan omschreven worden als een mengsel van vloeistoffen en halfvaste producten. Het werd gemaakt door eerst brood te maken van gerst, daarna het brood te mengen met water en nadien te koken. Hierna volgde afkoeling om dan spontane fermentatie te laten doorgaan door gisten en bacteriën die zich in de omgeving (in de lucht of in de potten zelf, *backslopping*) bevonden. Een spontaan fermentatieproces gaat vaak te traag door en resulteert in een grote variabiliteit van de eindproducten. Melkzuurbacteriën uit de omgeving, lucht of potten zullen in het mengsel groeien en melkzuur produceren (Hornsey, 2003). Hierdoor zal de pH dalen en werd de ontwikkeling van andere bacteriën geïnhibeed. Daarnaast had de zuurproductie waarschijnlijk ook een invloed op het vrijstellen van zetmeel uit de granen door de proteïnematrix rondom de zetmeelgranules gedeeltelijk af te breken. Een nadelig effect was, waarschijnlijk, dat het bier te zuur begon te smaken een aantal dagen na het brouwen, waardoor het bier vrijwel onmiddellijk diende geconsumeerd te worden.

Voor het brouwen vanaf 6000 B.C. waren er drie vereisten: (i) de aanwezigheid van geschikte granen, (ii) een controleerbare energiebron (vuurplaats) en (iii) geschikt brouwmateriaal zoals potten of metalen ketels. Naast de toenemende graanproductie, was het ook de kennis die men eerder had verkregen in behandeling en verwerking van granen (opslag, gecontroleerd kiemen en malen door molens) die de verdere ontwikkeling van het brouwproces heeft bevorderd (Meussdoerffer, 2009).

Het brouwproces veranderde nadien stelselmatig doorheen de tijd. Een opmerkelijke verandering was de manier waarop de ingrediënten gemengd en gekookt werden voor de start van de fermentatie. Gemouten granen, kruiden en andere componenten werden in een vat gebracht en langzaam opgewarmd tot het mengsel kookte (Mosher & Trantham, 2017). Deze langzame verwarming van het mengsel zorgde voor de omzetting van zetmeel in fermenteerbare suikers, waarna het koken zorgde voor de klaring van het mengsel. Na het koken werd het mengsel afgekoeld, waarna een spontaan fermentatieproces doorging.

In 822 werd, in het noorden van Frankrijk, hop ontdekt als smaakmaker in bier. Bovendien bewaarden bieren met hop langer door de antibacteriële werking van de iso- α -zuren in hop. Hierdoor werden (melkzuur)bacteriën afgedood en moest bier niet meer direct geconsumeerd worden na de fermentatie. Het probleem was echter dat hop moeilijk te verkrijgen was in Europa en dat de hoeveelheid voor een *batch* bier moeilijk te bepalen was. Dit kwam door de variabiliteit van de hoeveelheid bitterheid die hop toevoegde aan bier, wat resulteerde in een groot verschil in bitterheid tussen bieren van verschillende geografische regio's. Hop werd toen gezien als een onderdeel van gruit (Meussdoerffer, 2009). Tot op vandaag is niet duidelijk wat gruit juist was, er wordt beweerd dat dit een mix van kruiden is. Belangrijke componenten van gruit zijn geplette bladeren van *Myrica gale* (wilde gagel), rozemarijn, hop en andere kruiden. Deze geven een bittere maak aan het bier (Mosher & Trantham, 2017). Pas later werd hop op zichzelf een bieradditief (Meussdoerffer, 2009).

Er was toen een groot verschil in smaak en kwaliteit van bier over Europa heen. Afhankelijk van waar men leefde, had men bier op smaak gebracht met hop, gruit of andere kruiden. Daarnaast kon bier ook gemaakt zijn van gerst, tarwe, haver of zetmeelachtige gewassen. Hierdoor ontstond in 1516 het *Reinheitsgebot* in Beieren. Deze wet werd opgesteld om een uniformiteit in bier te verkrijgen, maar ook om ervoor te zorgen dat er niet te veel graan werd gebruikt voor de bierproductie, aangezien dit natuurlijk ook nodig was voor de productie van brood. Het *Reinheitsgebot* stelt dat bier moet gemaakt worden van gerst (granen), hop en water. Gist werd hier toen nog niet vermeld, aangezien men nog niet wist dat gist de fermentatie veroorzaakte (Mosher & Trantham, 2017). Het grote voordeel van granen als bron voor alcoholische dranken is dat het, mits goede opslag, het hele jaar door gebruikt kan worden. Het heeft daarnaast wel twee nadelen: (i) het zetmeel moet omgezet worden in fermenteerbare suikers en (ii) de weinige, bruikbare gisten voor het omzetten van suikers naar ethanol kunnen zich niet 'hechten' aan het graanoppervlak. Dus moet het brouwgist van een andere bron komen. Vaak werd hierbij gebruik gemaakt van het *backslopping* principe, waarbij door inoculatie van residu van de vorige fermentatie, de nieuwe fermentatie werd opgestart (Meussdoerffer, 2009).

Vanaf dan kan men spreken over verschillende basismodellen voor het brouwen. Deze bestonden uit een aantal typische handelingen: (i) voorbehandeling van de granen (kiemen, vermalen, weken, ...), zodat het zetmeel beschikbaar komt. Doordat dit proces toen nog niet op punt stond, werd naast granen ook een andere suikerbron toegevoegd zoals honing, sappen of micro organismen die exoenzymen (bv. amylase, geproduceerd door gist) maakten. (ii) Het

toevoegen van een component die de fermentatie uitvoert. (iii) Daarnaast was de contaminatie met ongewenste micro organismen een probleem, dit werd opgelost door het toevoegen van hop. Daarnaast kon ook nog gebruik gemaakt worden van melkzuurbacteriën en planten wat echter invloed had op de finale smaak (Meussdoerffer, 2009).

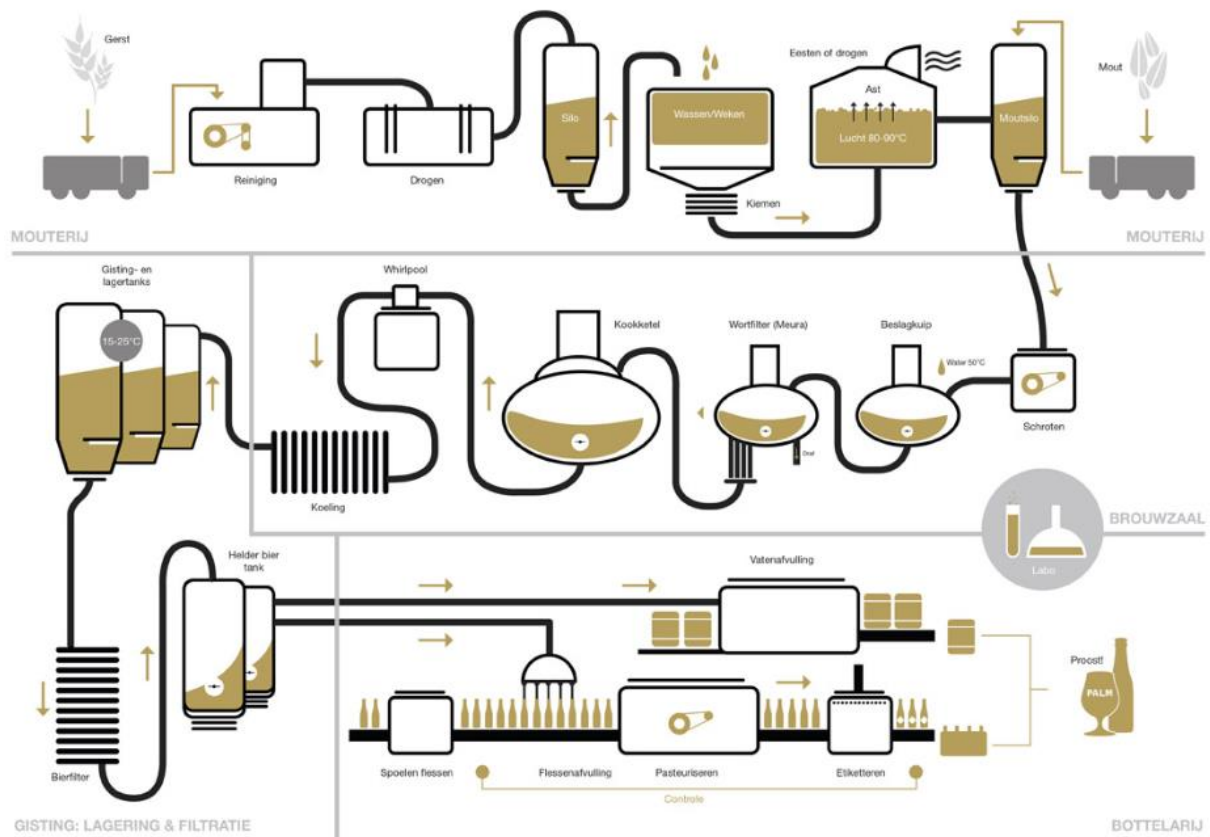
Momenteel worden melkzuurbacteriën nog gebruikt in de productie van Lambiek bieren, waar ze in het systeem worden geïmplementeerd via spontane fermentatie (Boon, 2019; Spitaels et al., 2014). Dit houdt in dat het koelen van het wort (extract van granen), overnacht aan de open lucht zal gebeuren. Hierdoor zal natuurlijke inoculatie plaatsvinden door gisten en melkzuurbacteriën uit de omgevingslucht. Lambiek bieren kunnen enkel gebrouwen worden in de late herfst, winter en vroege lente, aangezien het wort moet afgekoeld worden tot ongeveer 20°C op een nacht tijd. Na de inoculatie door blootstelling aan de lucht, zal de afgekoelde wort overgebracht worden in houten tonnen. De eigenlijke fermentatie start met een primaire alcoholische gisting door *Saccharomyces* gisten. Door een snelle start van de gisting, zullen wort-enterobacteriën onderdrukt worden. Na ongeveer 3 maanden zal de melkzuurfermentatie, door lactobacillen en pediococci, starten. Door latere ontwikkeling van *Brettanomyces bruxellensis* gist, ontstaat een tweede alcoholische gisting na 8 tot 12 maanden. Na 18 maanden bekomt Lambiek een typische smaak, die kan verbeterd worden door verder te laten rijpen.

3. Bierproductie

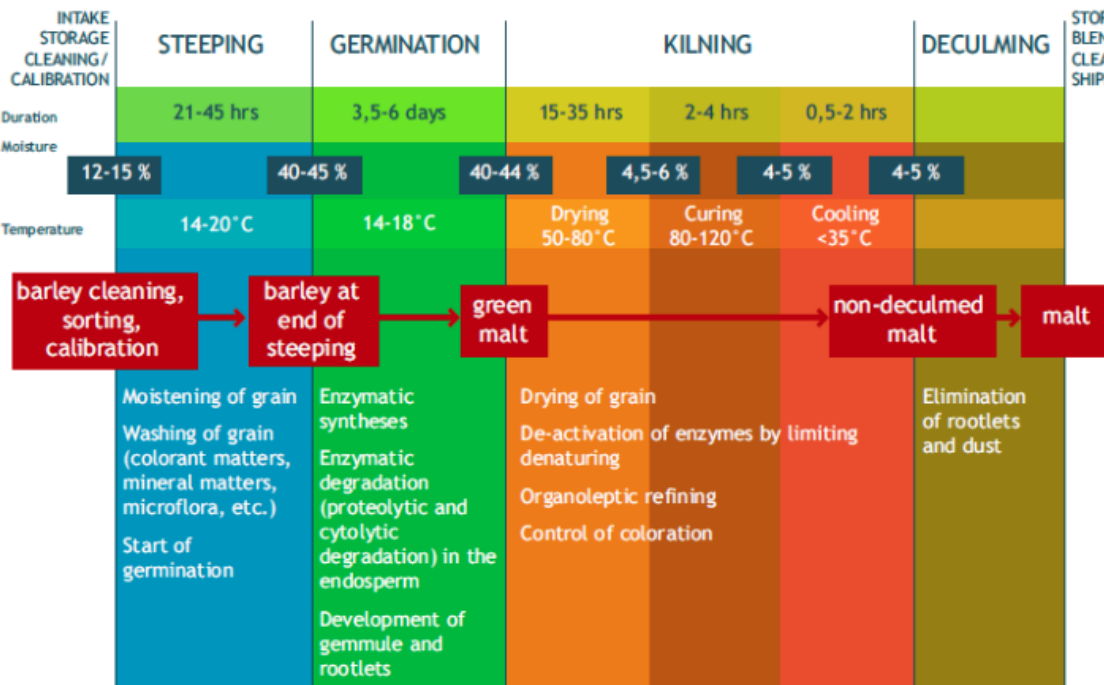
Om meer te weten te komen over het productieproces (figuur 2) is het belangrijk om te weten wat bier is en waaruit het gemaakt wordt. Men kan vier belangrijke grondstoffen onderscheiden die van belang zijn in het productieproces: gerst (of tarwe), water, hop en gist. Gerst wordt eerst gemouten om zo activatie en ontwikkeling van enzymen te veroorzaken. Door toevoeging van water aan de gemouten gerst, kan het brouwproces starten. Tijdens het brouwproces wordt de oplossing verwarmd, waarbij de eerder ontwikkelde enzymen fermenteerbare suikers zullen vrijstellen uit het zetmeel die in gerst aanwezig is. Na het extraheren van deze fermenteerbare suikers wordt een suikeroplossing, genaamd “wort”, verkregen. Aan wort kan ook hop toegevoegd worden om de bewaarbaarheid te verhogen en aroma's en smaken te bevorderen. Gist zal dan uiteindelijk de wort fermenteren en bier vormen (Lowe & Arendt, 2004; Rouse & van Sinderen, 2008).

3.1. Mouten

De eerste stap is dus het mouten van gerst/tarwe (figuur 3). Hierbij zal gerst/tarwe geweekt worden (*steeping*) in water (1-2 dagen) om het vochtgehalte te verhogen zodat kieming start. Bij het begin van de wortelkieming (*germination*), spreken we van *chit-malt*. Tijdens de kieming (4 dagen) van gerst, zal het embryo tot ontwikkeling komen en een wortel vormen (figuur 4). Daarnaast zullen uit de aleuronlaag enzymen vrijkomen die nodig zijn voor de hydrolyse van het aanwezige zetmeel tot maltose en glucose. Een deel van deze vrijgekomen suikers wordt tijdens het kiemproces reeds verbruikt voor het opbouwen van de wortel en kiem. Een probleem bij het kiemen kan de aanwezigheid zijn van bepaalde m.o. op het oppervlak van het graan. Deze kunnen onder andere zuurstof verbruiken, wat nodig is voor het kiemingsproces. Een voorbeeld van dit soort m.o. is *Fusarium* spp.. Hier kunnen melkzuurbacteriën ook een rol spelen, aangezien sommige de *Fusarium* spp. kunnen inhiberen (Lowe & Arendt, 2004; Oliveira et al., 2015). Daarnaast kan het toevoegen van melkzuurbacteriën de wortelgroei verminderen, waardoor meer suikers kunnen behouden worden voor de eigenlijke fermentatie i.p.v. voor de wortelgroei (Lowe & Arendt, 2004; Mosher & Trantham, 2017; Rouse & van Sinderen, 2008).



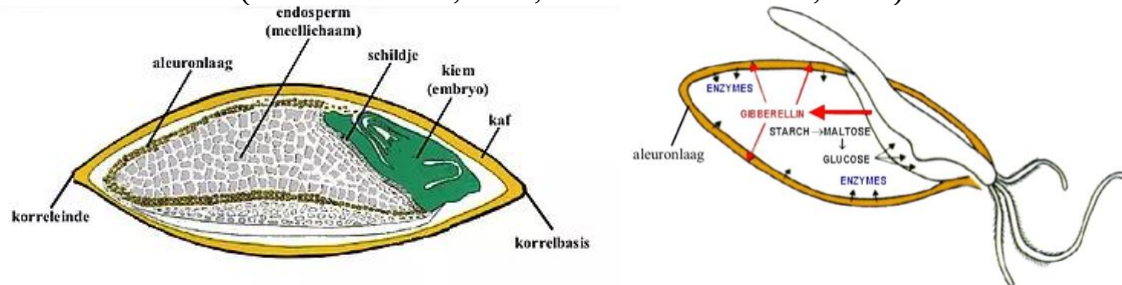
Figuur 2: Schematische voorstelling van het mout- en brouwproces (Palm, 2019).



Figuur 3: Schematisch overzicht van het moutproces (Malteurop).

Na het kiemen volgt het eesten of *kilning* (1 dag), het stoppen van het kiemproces. Dit gebeurt door de temperatuur op te drijven en de gekiemde graankorrels te drogen. Dit heeft als gevolg dat het vochtgehalte daalt, waardoor de enzymproductie stopgezet wordt en het mout beter kan bewaard worden. Tijdens het eesten zullen zich aroma- en kleurcomponenten vormen. Het is

belangrijk om het eesten niet te lang te laten doorgaan om secundaire reacties (zoals de Maillard-reactie) te vermijden, deze kunnen anders verandering van smaak, geur en kleur veroorzaken. Na het eesten volgt nog ontkieming (*deculling*), waarbij de gedroogde wortelkiemen verwijderd worden. Het eindproduct wordt mout genoemd. Mout is de bron van energie (suikers) en stikstof (uit aminozuren en peptiden) voor de micro organismen tijdens de fermentatie. De stikstofbron is nodig als voeding voor de aanmaak van gist-biomassa, tijdens de latere fermentatie. (Lowe & Arendt, 2004; Mosher & Trantham, 2017)



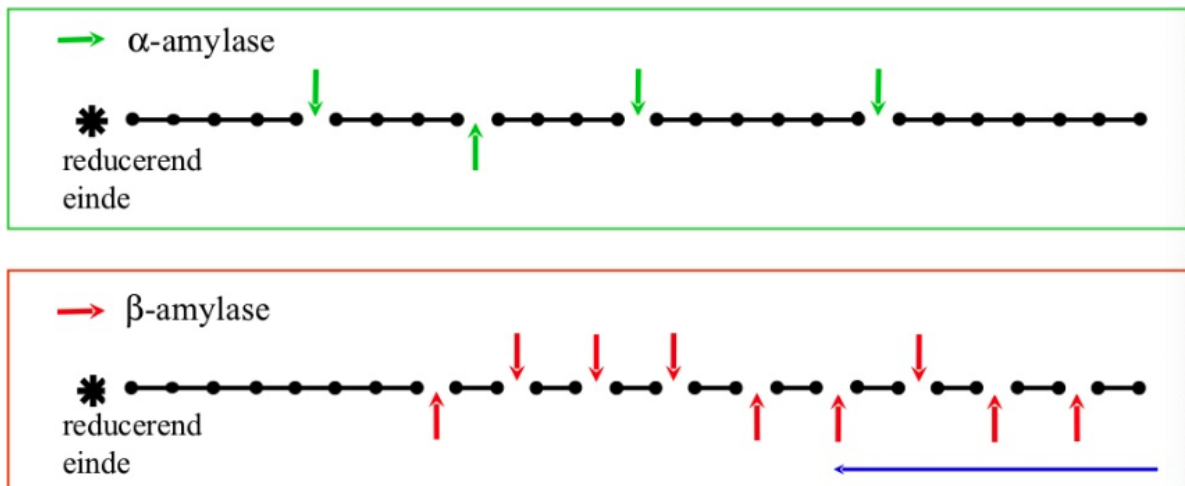
Figuur 4: Schematische voorstelling van een gerstkorrel voor kieming (links) en tijdens/na kieming (rechts) (Aerts).

3.2. Brouwen

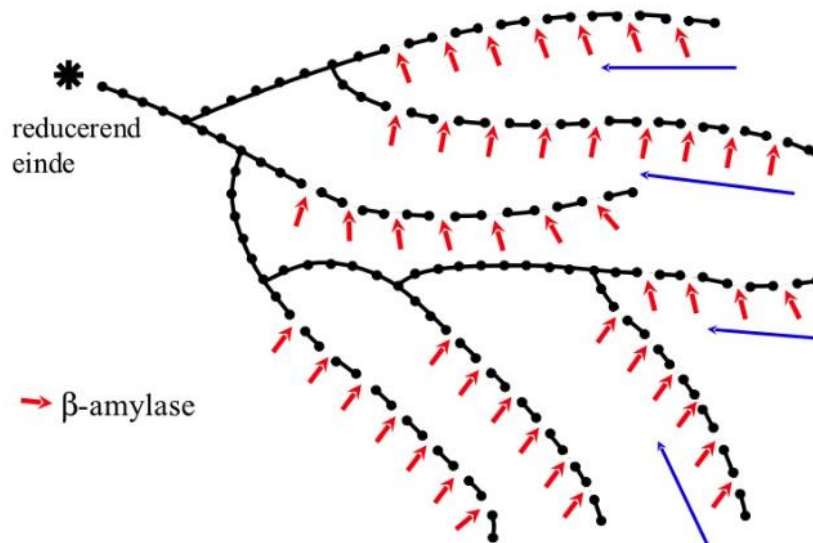
Na het mouten kan men beginnen aan het eigenlijke brouwen. Brouwen kan gedefinieerd worden als de enzymatische extractie van mout voor het verkrijgen van een (gedeeltelijk) vergistbare oplossing (Willaert, 2007). Het eigenlijke brouwproces begint met het malen van het mout (schroten) tot het zogenaamde “grist”. Hierbij wordt het gedroogde mout grof gemalen om het zetmeel bloot te stellen, waarna warm water wordt toegevoegd tijdens het *mashing-in*. Dit zorgt voor het oplossen van het vrijgekomen zetmeel in water (gelatinisatie). Bij de gelatinisatie kunnen er problemen optreden doordat er zetmeelgranules van verschillende grootte aanwezig zijn in het mout. Deze kunnen een verschillend gedrag vertonen tijdens het mouten en brouwen. De gelatinisatietemperatuur van grotere zetmeelgranules ligt bij 60-64°C, terwijl dit voor kleine granules op 70-80°C is (Puncha-arnon, Pathipanawat, Puttanlek, Rungsardthong, & Uttapap, 2008). Na de gelatinisatie volgt de enzymatische afbraak door α - en β -amylase. α -amylase zal het zetmeel afbreken zodat willekeurig dextrines worden gevormd, terwijl β -amylase maltose zal afsplitsen door α -1-4 bindingen te hydrolyseren van het niet-reducerend uiteinde van de zetmeelketens (figuur 5). Een beperking van β -amylase is dat het minder werkzaam is in de buurt van vertakkingen (α -1-6 bindingen), waardoor hoog-moleculaire dextrinen kunnen ontstaan (figuur 6). Deze zogenaamde β -grens-dextrinen kunnen de viscositeit verhogen, wat het verdere proces kan vertragen en bemoeilijken. Door het gebruik van α -amylase, zullen deze β -grens-dextrinen verkleind kunnen worden (Mosher & Trantham, 2017).

Om het zetmeel zo efficiënt mogelijk om te zetten, is het belangrijk om het zetmeel goed vrij te stellen uit het endosperm. Zoals te zien is in figuur 7 (links), bevindt het zetmeel zich onder de vorm van zetmeelgranules in endospermcellen. Deze zetmeelgranules zijn ingebed in een eiwitmatrix. Om het zetmeel goed te kunnen vrijstellen, zullen dus de celwand en deze eiwitmatrix moeten afgebroken worden. Zo zal β -glucanase de celwand afbreken. De celwand degradatie begint al bij het mouten op 42°C en gaat door tijdens het brouwen (Terra & Ferreira, 2012). Een niet-efficiënte omzetting van deze celwand betekent niet alleen dat het zetmeel niet goed vrijkomt, maar zal er ook voor zorgen dat een hoge viscositeit wordt bekomen waardoor problemen kunnen ontstaan tijdens de wort- en bierfiltratie. Naast β -glucanase zullen er ook proteasen nodig zijn om de eiwit-matrix af te breken. Deze proteasen zijn ook reeds werkzaam vanaf 40°C-45°C. Bij de afbraak zal ook stikstof vrijkomen dat de gistcellen zullen gebruiken

om biomassa aan te maken. Eiwit-degradatie heeft een grote invloed op de smaak, kleur (Maillard-reactie) en schuimvorming van het bier (Willaert, 2007).

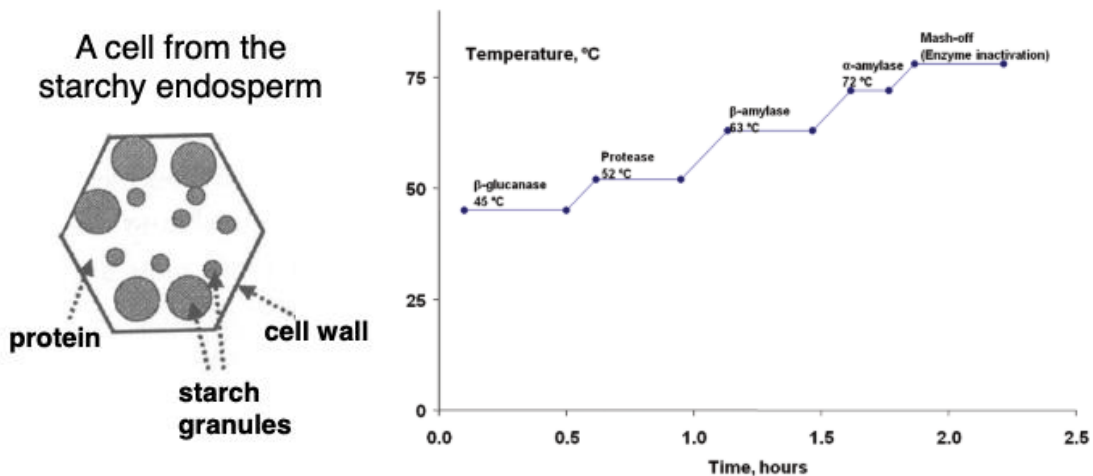


Figuur 5: Inwerking van α -amylase (boven) en β -amylase (onder) op amylose met de vorming van maltose en malto-oligosacchariden (Aerts).



Figuur 6: β -amylase inwerking op zetmeel met vorming van maltose en hoog-moleculaire dextrinen (Aerts).

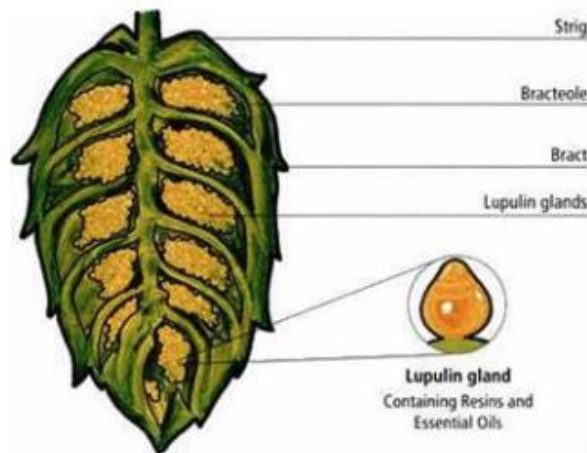
Tijdens de enzymatische afbraak van zetmeel, zullen de vrijgekomen suikers samen met andere nutriënten en aromacomponenten in de vloeistof oplossen en zo de wort vormen. In figuur 7 (rechts) is een schematisch overzicht te vinden van hoe de temperatuur in theorie kan opgedreven worden i.f.v. de tijd om een optimale werking van de verschillende enzymen te verkrijgen. Bij een goed moutproces zullen de stappen met β -glucanase en proteasen al gebeurd zijn, zodat het brouwproces kan starten bij een hogere temperatuur. In de praktijk zal dan ook vaak gestart worden bij een temperatuur van 63°C, die wordt opgedreven tot 72°C, zodat de amylases werkzaam zijn. Na de enzymatische omzetting volgt nog het *mashing-off*, hierbij wordt de temperatuur opgedreven tot ongeveer 78°C zodat de enzymactiviteit wordt stopgezet (Mosher & Trantham, 2017).



Figuur 7: (links) schematisch overzicht van endospermcel in gerst; (rechts) schematische weergave van de werktemperaturen voor de verschillende enzymen tijdens het brouwproces (Aerts).

Na de enzymatische afbraak volgt de *mash*-separatie. Hierbij worden de onopgeloste deeltjes, bestaande uit onder andere het kaf van het graan, verwijderd uit het wort via filtratie. De volgende stap is het koken van wort. Door het koken worden de aanwezige m.o. afgedood en de resterende enzymactiviteit stopgezet (Willaert, 2007). Koken heeft daarnaast nog andere functies. Tijdens het koken treedt bijvoorbeeld ook “warme breuk-formatie” op, waarbij componenten bestaande uit proteïnen en polyfenolen die niet oplosbaar zijn in het warme wort precipiteren (Kunze, 1999). Het warme breuk proces kan bevorderd worden door een lage pH (5,2), omdat de coagulatie van eiwitten het beste doorgaat rond het iso-elektrisch punt van deze eiwitten (Willaert, 2007). Slechte precipitatie van deze componenten zal leiden tot een slechte fermentatie omdat deze componenten zich op de celwand van de gistcellen zullen hechten. Hierdoor zullen de substraten, nodig voor de fermentatie, moeilijker bij de gist kunnen en de producten moeilijker vanuit de gistcellen naar buiten kunnen. Dit leidt dan weer op zijn beurt tot een beperkte pH-daling tijdens de fermentatie waardoor de kleinere eiwitten niet zullen precipiteren. Het gevolg hiervan is dat een bier wordt verkregen met een “harde” bittersmaak, afkomstig van deze eiwitten, en een slechte stabiliteit (Willaert, 2007). Het is dus ook belangrijk om wort na het koken nog te gaan klaren door de neerslag en hop-resten te verwijderen om de bierstabiliteit te verhogen (Mosher & Trantham, 2017). Dit kan gebeuren aan de hand van een *whirlpool*. Na de klaring dient de gekookte wort afgekoeld te worden om de gist onmiddellijk te kunnen toevoegen.

Tijdens het kookproces wordt ook hop toegevoegd, dit kan bij het begin van het kookproces om de bitterheid te verhogen of later in het kookproces om andere smaken en aroma's toe te voegen. Hop bevat veel verschillende componenten die belangrijk zijn voor het brouwproces zoals de hopharsen, essentiële oliën en polyfenolen. Deze componenten worden vooral aangetroffen in de lupulinekorrels van hop (figuur 8). De hopharsen zorgen voor de bittere smaak, de oliën voor aroma's en de polyfenolen voor een “vol mondgevoel”. Daarnaast zal hop ook de schuimstabiliteit verbeteren en zal het helpen om bederf van bier te vermijden, omdat het de groei van sommige m.o. afremt (Roncoroni, Verstrepn, Vangansbeke, Permsuvan, & Thyssen, 2018).



Figuur 8: Schematische voorstelling van een hopbel (Olsovská et al., 2016).

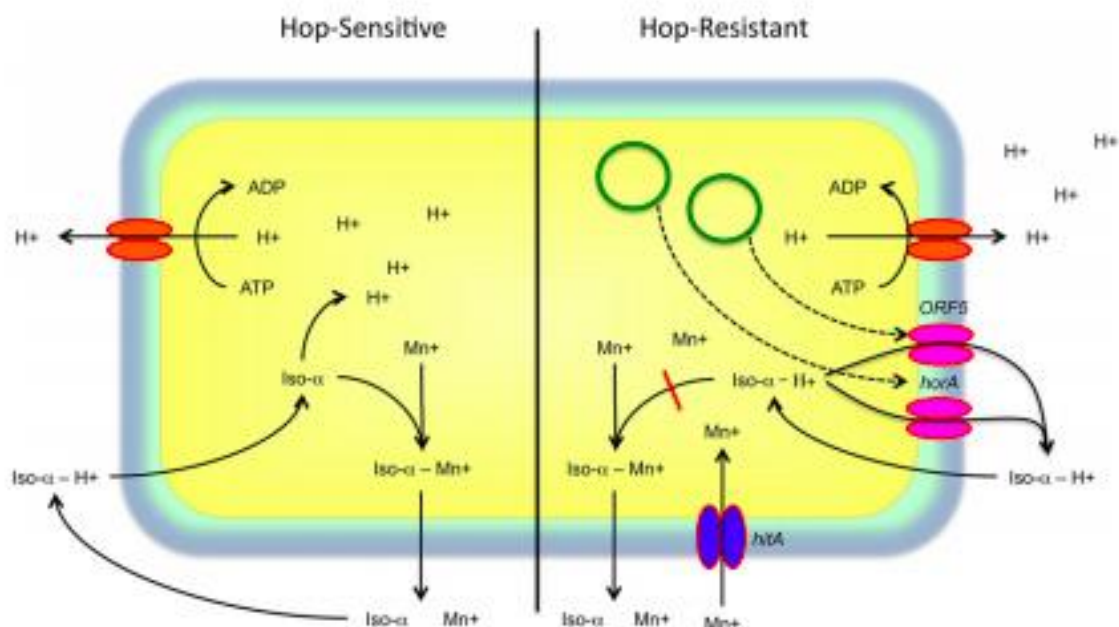
De bittermakende componenten van hop zijn onder andere α -zuren en β -zuren. α -zuren zullen tijdens het koken isomeriseren in iso- α -zuren, wat de bittere smaak geeft. β -zuren zijn niet bitter op zichzelf, maar zullen tijdens het koken componenten vrijgeven die de bitterheid van bier zullen beïnvloeden. De aromacomponenten van hop zijn humuleen, citronellol en myrceen. Humuleen bevat epoxides, die het bier voorzien van kruidige aroma's. Citronellol bevindt zich vooral in de essentiële oliën, heeft een fris aroma en zal bij hoppige bieren in hoge concentraties te vinden zijn. Myrceen is een monoterpeen met houtachtige, harsachtige en kruidachtige aroma's. Iedere hopsoort heeft hierbij zijn eigen specifieke kenmerken en kan dus voor een ander bier zorgen (Mosher & Trantham, 2017; Roncoroni et al., 2018).

Naast het bittermakende effect zullen de iso- α -zuren een tweede functie hebben. Ze hebben namelijk een antibacterieel effect. Bier is geen ideale omgeving voor de meeste m.o. om in te groeien. Er is eerst en vooral de aanwezigheid van ethanol, die varieert tussen 0,5% en 10% (v/v). Ethanol zal, door zijn amfotiele karakter, interageren met de fosfolipide dubbellaag van de membranen. Amfotielen zijn moleculen die zowel hydrofobe als hydrofiele eigenschappen bezitten en zullen zich in de membranen van bacteriën kunnen nestelen en het membraan vloeibaarder maken en mogelijk zelfs oplossen (Ingram, 1976). Hierdoor zal de permeabiliteit van het membraan verhogen, zodat eiwitten en andere celstructuren gedenateerd worden (Brissette, Russel, Weiner, & Model, 1990; Neidhardt, VanBogelen, & Vaughn, 1984). Daarnaast zal ethanol de membraanfunctie verstoren, waardoor bijvoorbeeld ionen lekken uit de cel en eventueel energie verloren gaat. Deze oorzaken hebben als gevolg dat de bacteriële cel afsterft (Ingram, 1976). Toch kan een bacterie zich hieraan aanpassen. Zo zijn er studies die aantonen dat bv. *E. coli* zich kan aanpassen aan de aanwezigheid van ethanol door de hoeveelheid onverzadigde vetzuren in het membraan te verhogen (Berger, Carty, & Ingram, 1980; Ingram, 1976).

Ook een verandering in de verhouding onverzadigd/verzadigde vetzuren in het membraan van *Clostridium acetobutylicum* werden aangetoond als respons op het toxische effect van ethanol (Lepage, Fayolle, Hermann, & Vandecasteele, 1987). Deze verschillende studies tonen aan dat het toxische effect kan tegengegaan worden door een verandering in membraansamenstelling (Horinouchi, Maeda, & Furusawa, 2018). Naast de hoge ethanolconcentraties, hebben ook de CO_2 -concentratie, de lage zuurstofconcentratie en de lage pH van het bier een negatief effect op de mogelijkheid tot groeien van m.o. Toch blijkt dat er verschillende stammen van melkzuurbacteriën (MZB) in staat zijn om te groeien in ongehoopt bier.

Door de toevoeging van hop zal de groei van Gram positieve bacteriën, waaronder deze MZB, geïnhibeerd worden (Suzuki, Iijima, Sakamoto, Sami, & Yamashita, 2006). Dit wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van iso- α -zuren. Iso- α -zuren zijn afkomstig van isomerisatie van α -zuren tijdens het kookproces, waarbij nooit 100% isomerisatie optreedt. De omzetting, ook wel hop utilisatie genoemd, bedraagt maximum 40% (Mudura, Muste, Tofana, Socaci, & Goia, 2008). Tegenwoordig wordt vaker afgeweken van de conventionele hopping methode (het toevoegen van hop tijdens het kookproces) en wordt gebruik gemaakt van bijvoorbeeld *dry-hopping*. Dit is een techniek waarbij een koude extractie gebeurt van de vluchtige en niet-vluchtige componenten van hop, door hop pas toe te voegen tijdens de fermentatie of de lagering van het bier. Hierdoor zal een betere stabiliteit van de flavour bekomen worden (Lafontaine & Shellhammer, 2018; Schönberger & Kosteletzky, 2011). Daarnaast kunnen ook geïsomereerde extracten toegevoegd worden tijdens de lagering om de bitterheidsstabiliteit te verhogen.

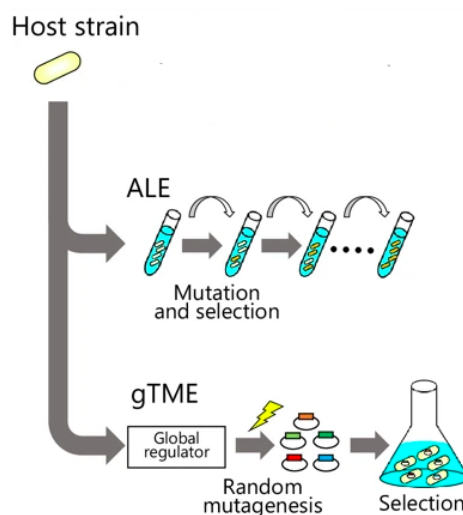
Over het effect van α -zuren kon echter niets teruggevonden worden in de literatuur, maar zoals eerder vermeld spelen de iso- α -zuren hun rol bij het inhiberen van de groei van Gram positieve bacteriën. Deze zullen namelijk optreden als protonoforen. Protonoforen zijn moleculen die het transport van protonen doorheen membranen katalyseren. Dit doen ze door de protonen in het extracellulaire milieu aan zich te binden, doorheen de membraan te transporteren en deze uit te wisselen met intracellulair Mn^{2+} . Het gebonden Mn^{2+} wordt terug mee getransporteerd naar het extracellulaire milieu en losgelaten. Dit proces is schematisch te zien in figuur 9 (Bokulich & Bamforth, 2013; Simpson, 1993a, 1993b). Dit zal tot gevolg hebben dat de pH van het intracellulaire milieu daalt, wat dan weer een invloed heeft op het metabolisme en de nutriënt-opname van de cel (Poolman, Driessen, & Konings, 1987; Suzuki, Asano, Iijima, & Kitamoto, 2008). Naast de invloed op het intracellulaire milieu, zal de influx van protonen door de cel ook een daling in energieproductie als gevolg hebben. De cel zal namelijk een ATP-gedreven protonenpomp activeren om het te veel aan protonen naar buiten te pompen, waardoor veel energie verloren gaat en de cel uitgeput geraakt en eventueel sterft (Bokulich & Bamforth, 2013; Kashket, 1987; Suzuki et al., 2008).



Figuur 9: Invloed iso- α -zuren op Gram positieve bacteriën (links) en de mogelijke resistentiemechanismen (rechts) (Bokulich & Bamforth, 2013).

Er zijn echter verscheidene MZB stammen die hop-resistentiemechanismen ontwikkeld hebben (figuur 9) (Richards & Macrae, 1964; Sami et al., 1997; Suzuki, Sami, Ozaki, & Yamashita, 2005). Dit fenomeen wordt ook wel hop adaptatie genoemd. Een hop resistentie gen (*horA*) kon worden teruggevonden op een plasmide in een *Lactobacillus brevis* stam (Sami et al., 1997). Door het sequencen van dit plasmide, heeft men ontdekt dat dit plasmide een *open reading frame* (ORF) bevat die codeert voor een membraanproteïne (Fath & Kolter, 1993; Sakamoto, Margolles, Van Veen, & Konings, 2001; Van Veen et al., 1996). Naast deze membraanexporters, zijn er nog andere resistentiemechanismen. Zo is er ook het *hitA*-gen dat door hop-resistente cellen zal afgeschreven worden om een hop-geïnduceerde kation transporter aan te maken. De membraantransporter zal mangaan in de cel brengen tegen de proton gradiënt in. Deze mangaanmoleculen zullen de iso- α -zuren binden en buiten de cel brengen via diffusie. Door de *hitA*-transporter zal er meer Mn^{+} in de cel komen en dus meer iso- α -zuren kunnen verwijderd worden uit het intracellulaire milieu (Bokulich & Bamforth, 2013; M. Fraunhofer, 2018; Hayashi, Ito, Horiike, & Taguchi, 2001).

Om een bier te produceren met MZB dient dus rekening gehouden te worden met de tolerantie, van de gekozen MZB, tegen ethanol, α -zuren en iso- α -zuren. Een mogelijkheid is om zelf een tolerante stam te gaan vormen. Hiervoor zijn twee strategieën mogelijk (figuur 10). Via *global transcription machinery engineering* (gTME) worden verschillende fenotypen bekomen via het herprogrammeren van de transcriptiegenen. Dit gebeurt door DNA-fragmenten van het organisme te onderwerpen aan error-prone PCR (Tan et al., 2016). Hierbij ontstaan fouten bij het amplificeren van DNA-fragmenten. Na de PCR kunnen deze geamplificeerde DNA-fragmenten gekloneerd worden in een expressievector (bijvoorbeeld een plasmide), waarna deze vectoren in de micro organismen gebracht worden en er tolerantie kan optreden. Een tweede techniek is *adaptive laboratory evolution* (ALE), waarbij een micro organisme wordt gegroeid in bijvoorbeeld een milieu die een bepaald percentage aan ethanol, α -zuren of iso- α -zuren bevat (Dragosits & Mattanovich, 2013). Het microorganisme kan hierbij een natuurlijke mutatie verkrijgen, waardoor tolerantie wordt opgebouwd tegen deze componenten. Na het groeien kan een selectie gemaakt worden van de meest tolerante cellen, die daarna opnieuw worden opgekweekt in een medium met een hoger percentage alcohol of hoger gehalte aan iso- α -zuren. Door deze stappen enkele keren te herhalen kunnen hoog tolerante stammen ontwikkeld worden (Dragosits & Mattanovich, 2013; Horinouchi et al., 2018; Winkler & Kao, 2014).



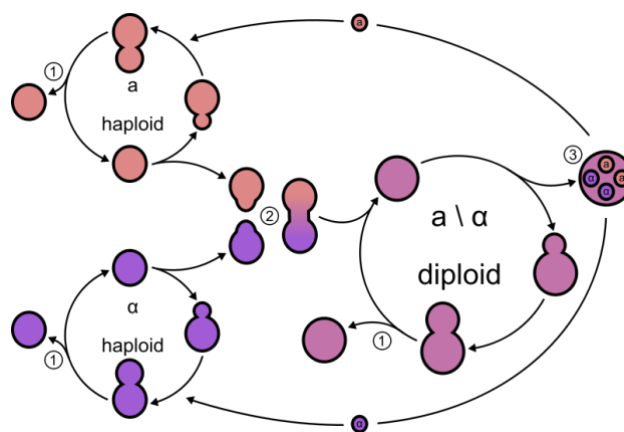
Figuur 10: Twee strategieën voor de vorming van alcohol-tolerante bacteriën: adaptive laboratory evolution (ALE) en global transcription machinery engineering (gTME) (Horinouchi et al., 2018).

3.3. Fermenteren

Het fermentatieproces begint met het toevoegen van de gist aan de afgekoelde wort (*pitching wort* genoemd), waarna de gist de fermentatie uitvoert. Het bier wordt na fermentatie gelagerd, zodat bepaalde componenten zoals diacetyl gereduceerd worden en een smaakverandering optreedt. Eventueel kan nadien nog een centrifugatiestap volgen.

4. Gisten

Het belangrijkste m.o. bij de fermentatie is natuurlijk de gist. Gisten zijn ééncellige eukaryote m.o. die behoren tot de fungi. Ze zijn bolvormig of ovaal en meten ongeveer 5-10 μm in diameter. Ze hebben een optimale groeitemperatuur bij 20-30°C, maar sommige groeien ook bij lagere (2-10°C) of hogere (40-45°C) temperaturen. Daarnaast gedijen ze het beste bij een pH van 4,5-7,0, maar ook hier kunnen sommige gisten bij hogere of lager pH overleven (Kurtzman, Fell, Boekhout, & Robert, 2011; Mosher & Trantham, 2017). Gisten zijn facultatief anaeroob, dit betekent dat ze kunnen groeien bij aan- of afwezigheid van zuurstof (Mosher & Trantham, 2017). Gisten kunnen zich asexueel en seksueel vermenigvuldigen (figuur 11) (Usher, 2019). Bij de asexuele vermenigvuldiging zullen ze gebruik maken van knopvorming. Hierbij zal een uitstulping ontstaan op het celmembraan van de haploïde moedercel. Deze uitstulping of “knopje” zal groeien, waarna ook de celkern zich zal delen en één van beide kernen zich zal verplaatsen naar de nieuwe knop. Hierna snoert de knop zich af en wordt een dochter- en moedercel verkregen. Dit proces kan ongeveer iedere 80 minuten doorgaan onder optimale omstandigheden (Stewart, 2017). Wanneer afgeweken wordt van deze optimale omstandigheden, bijvoorbeeld bij weinig nutriënten, zal seksuele vermenigvuldiging plaatsvinden. Hierbij zullen twee haploïde cellen (a en α) een fusie ondergaan en een diploïde zygote (a/ α) vormen. Er zal een ascus (sporenzakje) met 4 haploïde ascosporen gevormd worden, waarna lytische enzymen (glucanases) de ascuswand zullen verwijderen. Hierdoor komen de vier sporen vrij om daarna de cyclus te kunnen herhalen. De nieuwe cellen afkomstig uit deze sporen kunnen beter bestand zijn tegen de stressvolle omstandigheden (Boulton & Quain, 2008; Gallone et al., 2018; Robinow & Johnson, 1991; Stewart, 2017).

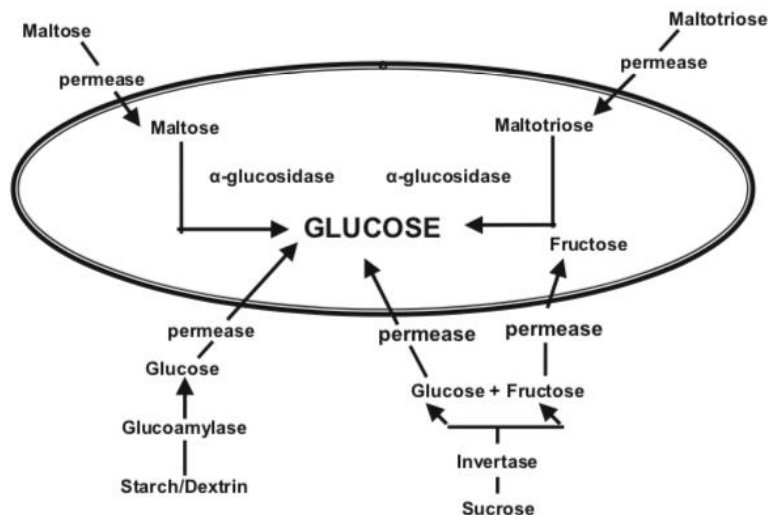


Figuur 11: Schematische voorstelling van de asexuele en seksuele cyclus van gisten: 1. Knopvorming, 2. fusie van twee haploïde cellen, 3. Sporenvorming (Usher, 2019).

Brouwersgisten behoren vaak tot het *Saccharomyces cerevisiae* species. In de praktijk, spreekt men van twee grote soorten. De bovengistende gisten (*S. cerevisiae*), die werkzaam zijn op hogere temperaturen (optimaal 16-24°C) en gebruikt worden voor de *ale*-productie. En de ondergistende gisten (*S. pastorianus*), die werkzaam zijn op lagere temperaturen (optimaal 7-13°C) en gebruikt worden voor de *lager*-productie.

4.1. Metabolisme

De meeste species van gisten kunnen suikers omzetten tot ethanol via fermentatie (anaeroob). Deze omzetting gebeurt aan de hand van verschillende enzym-gecatalyseerde stappen. Maar om deze omzetting te kunnen doen, moeten de suikers eerst de gistcellen betreden (figuur 12). De fermentatie zal starten aan de hand van glucose, maar ook fructose, maltose, maltotriose en dextrines kunnen opgenomen worden, om in de cel omgezet te worden tot glucose. Sucrose zal eerst gehydrolyseerd worden tot glucose en fructose in het periplasma door een extracellulair invertase. Daarna zullen deze opgenomen worden door de cel m.b.v. permeases. Ook maltose en maltotriose zullen via permeases de cel betreden om binnenin de cel via α -glucosidase omgezet te worden tot glucose. Zetmeel/dextrines kunnen niet rechtstreeks opgenomen worden, maar moeten eerst omgezet worden tot glucose of maltose, alvorens de gist deze kan opnemen (Stewart, Hill, & Russell, 2013).



Figuur 12: Schematische voorstelling van de opname van suikers door gistcellen (Stewart et al., 2013).

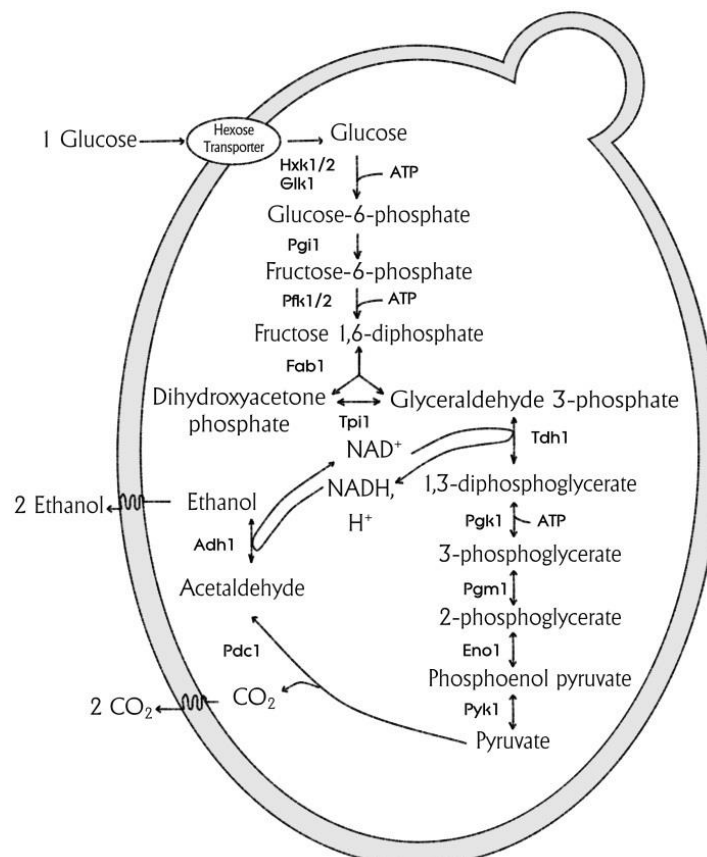
Eenmaal de suikermoleculen in de gistcel aanwezig zijn, kan de dissimilatie anaeroob of aeroob gebeuren. De aerobe afbraak van suikers wordt bestempeld als respiratie. Hierbij worden de suikers omgezet tot CO_2 , water, energie en celbiomassa. Uit de vrijgekomen energie kunnen dan nieuwe gistcellen (biomassa) gevormd worden. De anaerobe afbraak van de suikers door gistcellen, wordt fermentatie genoemd. Hierbij zullen ethanol, CO_2 en aromatische componenten gevormd worden. Fermentatie genereert echter weinig energie, zodat weinig nieuwe cellen gevormd kunnen worden.

De aanwezigheid en concentratie van glucose heeft invloed op de genexpressie van gisten, waarbij de belangrijkste de transcriptionele regulatie van genen in verband met het fermentatieve metabolisme is. Deze genen coderen, bij hoge concentraties aan glucose, voor enzymen in verband met de glycolyse. Na de eerder beschreven opname van glucose, zal dit in de glycolytische pathway omgezet worden tot pyruvaat (figuur 13). De eerste stap is de fosforylatie van glucose tot glucose-6-fosfaat door hexokinase (Hxk) en glucokinase (Glk), belangrijk om op te merken is dat deze stap energie nodig heeft in de vorm van ATP. Daarna wordt glucose-6-fosfaat geïsomereerd tot fructose-6-fosfaat door fosfoglucoze isomerase (Pgi). De daaropvolgende stap is de omzetting tot fructose-1,6-bifosfaat door fosfofructokinase (Pfk), ook hier is ATP nodig als energiebron. Aldolase (Fab) zal fructose-1,6-bifosfaat splitsen in glyceraldehyde-3-fosfaat en dihydroxyaceton-fosfaat. Belangrijk is om op te merken dat deze twee componenten reversibel in elkaar kunnen omgezet worden via triosefosfaat isomerase (Tpi). Glyceraldehyde-3-fosfaat zal geoxideerd worden door NAD^+ (waarbij NAD^+ wordt

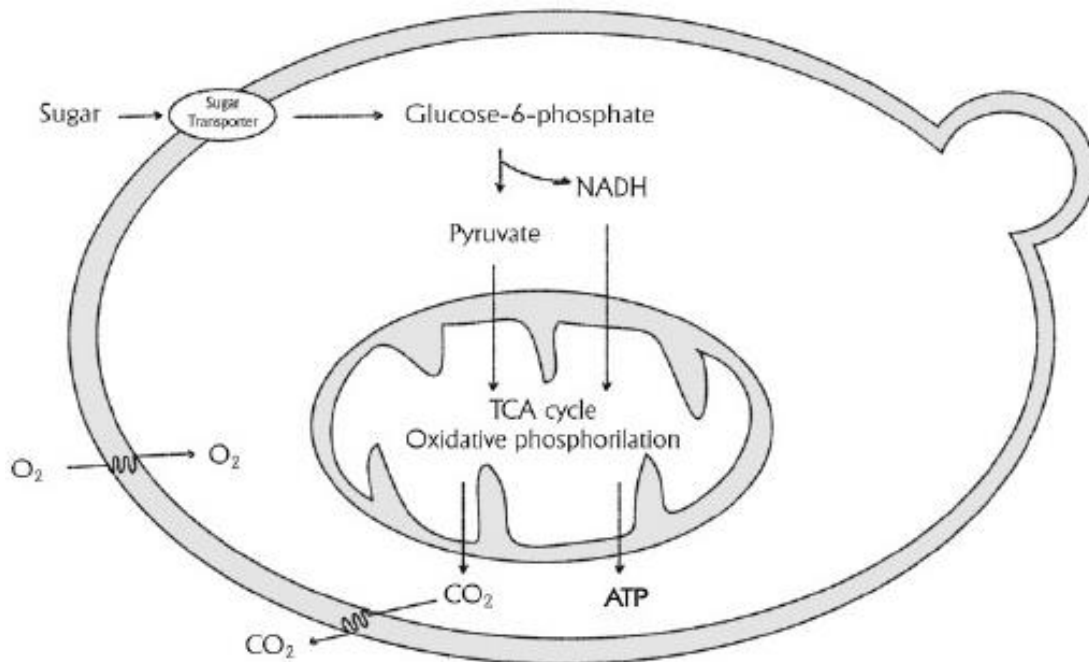
omgezet tot NADH) en nadien gefosforyleerd tot 1,3-difosfoglyceraat. Waarna fosfoglyceraat kinase (Pgk) de 1,3-difosfoglyceraat zal omzetten tot 3-fosfoglyceraat, door een fosfaatgroep te doneren aan ADP en ATP te vormen. De volgende stap is een relocatie van een fosfaatgroep naar positie 2 door fosfoglyceraat mutase (Pgm). 2-fosfoglyceraat zal nadien door enolase (Eno) omgezet worden tot fosfoenol pyruvaat, een hoger energetisch molecule. Fosfoenol pyruvaat wordt nadien gefosforyleerd, door pyruvaat kinase (Pyk), tot pyruvaat (samen met de regeneratie van ATP). Pyruvaat kan vervolgens omgezet worden via verschillende metabolische routes, afhankelijk van de omgevingsomstandigheden. (Boulton & Quain, 2008; Faria-Oliveira, Puga, & Ferreira, 2013)

Bij de alcoholische fermentatie (figuur 13) zal pyruvaat gedecarboxyleerd worden tot acetaldehyde en CO₂. In de finale reactie, gekatalyseerd door alcohol dehydrogenase (Adh), zal acetaldehyde gereduceerd worden tot ethanol. Hierbij zal ook het eerder geproduceerde NADH geregenereerd worden tot NAD⁺. Daarnaast kunnen, op hetzelfde moment, ook suikers omgezet worden tot bij-producten zoals biomassa, zuren (ketoglutaraat, lactaat, pyruvaat), acetaldehyde en glycerol. Deze zijn afkomstig van dihydroxyaceton fosfaat (Boulton & Quain, 2008; Faria-Oliveira et al., 2013).

Bij de aerobe respiratie (figuur 14), wordt het pyruvaat omgezet tot acetyl-CoA via een oxidatieve decarboxylatie. De gevormde acetyl-CoA zal in de Krebs cyclus oxidatief gedecarboxyleerd worden, waarbij reducerende componenten ontstaan. Deze worden dan gebruikt voor de vorming van energie (ATP) via de elektronentransportketen (Boulton & Quain, 2008; Faria-Oliveira et al., 2013).



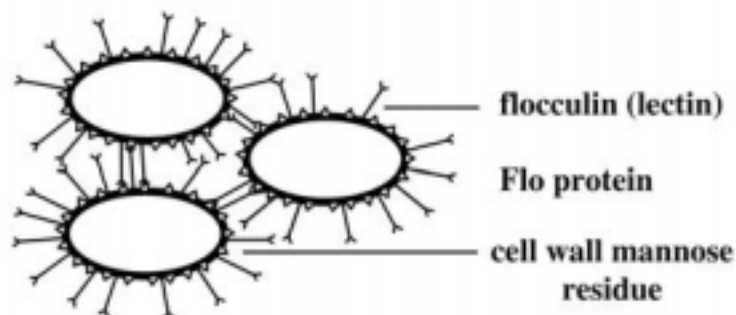
Figuur 13: Alcoholische fermentatie - enzymatische stappen bij *Saccharomyces cerevisiae* (Faria-Oliveira et al., 2013).



Figuur 14: Aerobe respiratie in *Saccharomyces cerevisiae* (Faria-Oliveira et al., 2013).

4.2. Flocculatie

Door middel van flocculatie zullen gistcellen na de fermentatie afgescheiden kunnen worden van het bier. Flocculatie is de aggregatie van gistcellen in vlokken. De flocculatie staat onder genetische controle (minstens 11 verschillende genen; FLO-1, FLO-2, ...) en zal in de late stationaire fase in gang worden gezet door een te kort aan nutriënten. Daarnaast zijn er verschillende omgevingsomstandigheden die flocculatie beïnvloeden; zoals calcium-ionen, temperatuur, pH en ethanolconcentratie. Flocculatie is het resultaat van glycoproteïnen (lectine, die geactiveerd wordt door calcium) die op de celwand van naburige cellen binden met phosphomannan (figuur 15) (Bony, Thines-Sempoux, Barre, & Blondin, 1997; Verstrepen, Derdelinckx, Verachtert, & Delvaux, 2003).



Figuur 15: Schematische overzicht van flocculatie, waarbij lectine bindt aan de celwand van naburige cellen via phosphomannan (Verstrepen, Derdelinckx, Verachtert, et al., 2003).

5. Melkzuurbacteriën

Melkzuurbacteriën zijn Gram-positieve bacteriën die behoren tot de familie van de Firmicutes en die gegroepeerd worden op basis van hun morfologie, fysiologie of metabolisme (Axelsson, 2004). Ze zijn anaeroob, maar kunnen ook aerotolerant zijn. De cellen zijn staafvormig (bv. *Lactobacillus*) of bolvormig (bv. *Lactococcus*) en bevinden zich alleen, in lange ketens of in tetraden. Daarnaast vormen ze geen sporen, zijn niet bewegende bacteriën en katalase-negatief. Melkzuurbacteriën hebben een optimale groeitemperatuur rond de 25-40°C en zijn zuurtolerant, met een optimum bij pH 4,0-6,0. MZB zijn vooral te vinden in een milieu, rijk aan nutriënten zoals in voeding. Daarnaast zijn het ook commensalen van de mond en het

gastro-intestinaal systeem van zoogdieren. MZB zijn de meest belangrijke m.o. die gebruikt worden in de voedingsindustrie. De koolstofbron die beschikbaar is in voeding wordt gefermenteerd, waarbij melkzuur wordt geproduceerd. Dit leidt tot een daling van de pH, die de veiligheid en bewaring van voeding verhoogt door de groei van pathogenen te verminderen. Daarnaast zullen MZB bijdragen aan de voedingswaarde, textuur en flavour van gefermenteerde voeding zoals melkproducten, zuurdesembrood, gefermenteerd vlees of groenten en gefermenteerde dranken (Lee, Nielsen, & Stephanopoulos, 2016).

5.1. Metabolisme

Er kunnen twee grote fermentatie pathways onderscheiden worden bij melkzuurbacteriën. De glycolyse of Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) resulteert in melkzuur als enige eindproduct (Axelsson, 2004). Dit soort melkzuurbacteriën worden homofermentatieve melkzuurbacteriën genoemd. Daarnaast is er ook nog de fosfoketolase pathway die resulteert in melkzuur, ethanol, acetaat en CO₂. Dit wordt de heterofermentatieve pathway genoemd.

De glycolyse (figuur 16) zal glucose omzetten tot fructose-1,6-difosfaat (FDP). Dit wordt gesplitst via aldolase in dihydroxyacetonfosfaat (DHAP) en glyceraldehyde-3-fosfaat (GAP), waarbij DHAP kan omgezet worden in GAP. GAP kan omgezet worden in pyruvaat, dat nadien wordt gereduceerd via fermentatie tot melkzuur via NAD⁺-afhankelijke lactaat dehydrogenase voor de regeneratie van NAD⁺. In theorie kan via deze pathway, per mol glucose, 2 ATP gevormd worden en 2 mol lactaat (Axelsson, 2004; Burgé et al., 2015).

De fosfoketolase pathway (figuur 17) zal 6-fosfogluconaat vormen uit glucose door verschillende dehydrogenatie stappen. Hierna zal via decarboxylatie ribulose-5-fosfaat gevormd worden, die zal worden omgezet tot xylulose-5-fosfaat (X5P). X5P wordt gesplitst door fosfoketolase in glyceraldehyde-3-fosfaat (GAP) en acetylfosfaat (AcP). GAP wordt gemetaboliseerd tot lactaat, zoals eerder beschreven in de glycolyse pathway. Wanneer er geen externe elektronen acceptoren beschikbaar zijn, zal acetylfosfaat gereduceerd worden tot ethanol via acetyl CoA en acetaldehyde. Bij deze pathway kan in theorie 1 mol lactaat, 1 mol ethanol, 1 mol CO₂ en 1 ATP gevormd worden per mol glucose (Axelsson, 2004; Burgé et al., 2015).

Naast glucose kunnen ook nog andere hexoses (zoals mannose, galactose en fructose) gefermenteerd worden door MZB. Deze suikers treden de pathways binnen ter hoogte van glucose-6-fosfaat of fructose-6-fosfaat na isomerisatie en/of fosforylatie en kunnen door zowel de glycolytische als de fosfoketolase pathway verwerkt worden.

Op basis van suiker fermentatie patronen, kunnen melkzuurbacteriën verdeeld worden in drie metabolische categorieën (Axelsson, 2004). De eerste is deze van de obligaat homofermentatieve MZB (onder andere groep I lactobacilli). Dit betekent dat de suikers enkel gefermenteerd worden via de glycolyse. De tweede categorie is deze van de obligaat heterofermentatieve MZB (*Leuconostoc*, groep III lactobacilli, *oenococchi*, *weissellas*). Deze gebruiken enkel de fosfoketolase pathway om de suikers te fermenteren. Het verschil tussen beide is de aan- of afwezigheid van specifieke enzymen. Zo zullen obligaat homofermentatieve MZB FDP-aldolase bevatten maar fosfoketolase ontbreken. Dit leidt tot het verschil in de vorming van eindproducten. De derde categorie (groep II lactobacilli, *enterococchi*, *lactococchi*, *pediococchi*, *streptococchi*, ...) behoort tot de facultatief heterofermentatieve MZB, omdat ze FDP-aldolase bezitten die resulteert in de glycolytische omzetting. Maar deze MZB zullen echter in aanwezigheid van pentose-suikers fosfoketolase aanmaken, zodat heterofermentatie optreedt. Er valt wel op te merken dat wort geen/amper pentosen bevat.

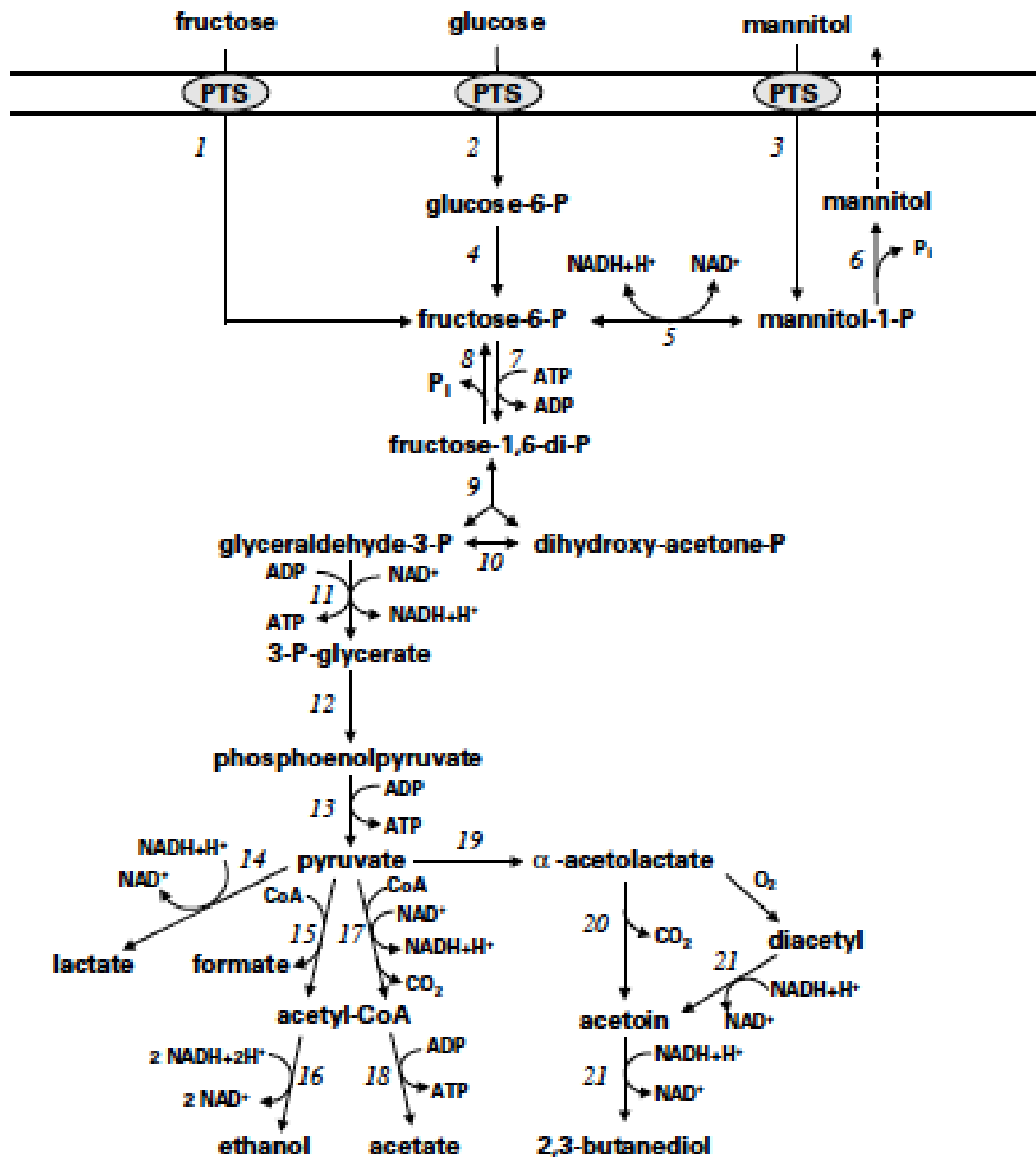
5.2. Alternatieve pyruvaat pathway

MZB kunnen hun metabolisme veranderen in respons op variërende condities. Dit geeft vaak een verschillend eindproduct dan blijkt uit de vorige pathways. De veranderingen zijn meestal te wijten aan een veranderend pyruvaat metabolisme. Tijdens bacteriële fermentaties kan substraat geoxideerd worden om energierijke intermediären te genereren. Deze kunnen gebruikt worden voor de ATP-productie bij de substraat-fosforylatie. De oxidatie resulteert in NADH-vorming vanuit NAD⁺, deze moet geregenereerd worden zodat de fermentatie kan blijven duren. Pyruvaat dient als elektronacceptor voor deze regeneratie van NAD⁺. Onder bepaalde omstandigheden kunnen MZB alternatieve pyruvaat-metabolismen gebruiken dan de reductie tot lactaat. In figuur 18 zijn deze alternatieve pathways te zien, afhankelijk van bepaalde condities en aanwezige enzymen (Axelsson, 2004; Gänzle & Follador, 2012).

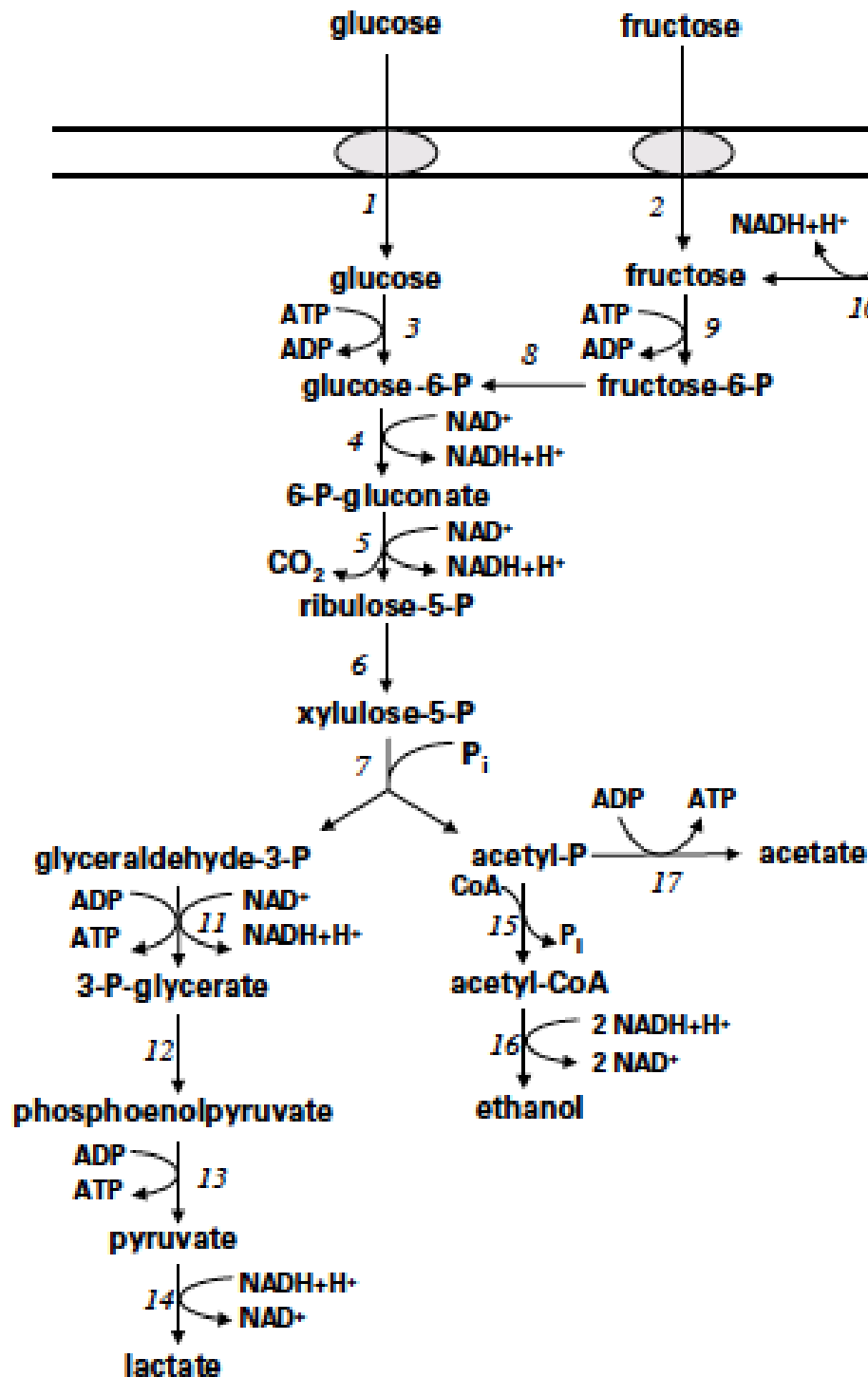
De pathway die leidt tot diacetyl en acetoine/2,3-butanediol is een veel voorkomende alternatieve pathway. Dit metabolisme treedt echter op als er meer pyruvaat aanwezig is dan nodig voor de regeneratie van NAD⁺. Deze overmaat aan pyruvaat kan komen doordat er een extra bron van pyruvaat, behalve de koolhydraten, aanwezig is in het medium of doordat een andere component (dan pyruvaat) optreedt als elektronacceptor bij de regeneratie (Axelsson, 2004; Gänzle & Follador, 2012).

Een andere pathway is deze van het pyruvaat-formaat lyase systeem. Het lyase zal pyruvaat en CoA omzetten tot formaat en acetyl CoA. Daarnaast kan acetyl CoA ook gevormd worden uit pyruvaat via pyruvaat dehydrogenase. De gevormde acetyl CoA kan nadien gebruikt worden als elektronenacceptor, resulterend in ethanolvorming, maar kan ook dienstdoen als precursor voor substraat fosforylatie tot acetylfosfaat. Dit wordt dan weer op zijn beurt omgezet via acetaat kinase naar acetaat (Axelsson, 2004; Gänzle & Follador, 2012).

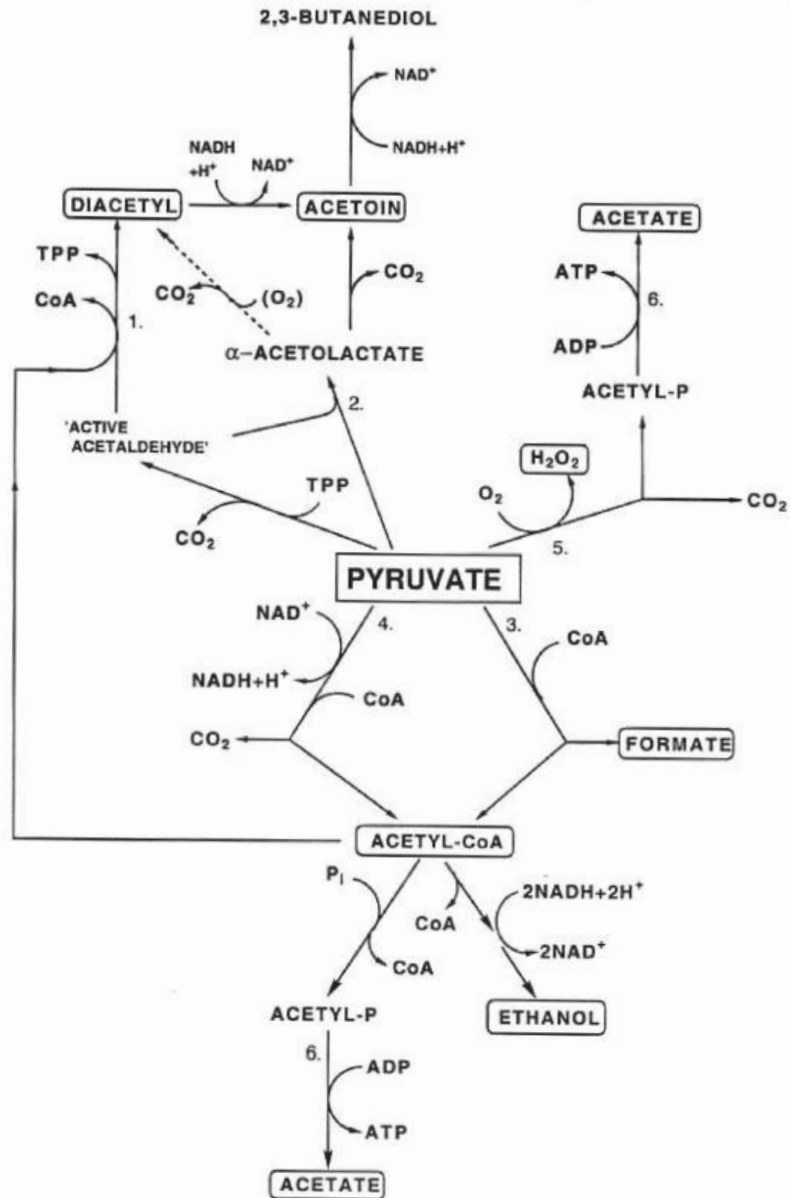
Bij aanwezigheid van zuurstof, zal pyruvaat via pyruvaat oxidase omgezet worden in CO₂ en acetylfosfaat. Dit laatste kan via acetaat kinase omgezet worden tot acetaat. Aangezien dit metabolisme optreedt in aanwezigheid van zuurstof, wordt deze pathway niet verwacht bij een correct lopende fermentatie van wort (Axelsson, 2004; Gänzle & Follador, 2012).



Figuur 16: Homofermentatieve metabolisme van MZB. 1 en 2 fosfoenolpyruvaat (PEP)-afhankelijk suiker fosfotransferase systeem (PTS); 3 mannitol-specifiek PTS; 4 fosfoglucoze isomerase; 5 mannitol-1-fosfaat dehydrogenase; 6 mannitol 1-fosfatase; 7 6-fosfofructokinase; 8 fructose-difosfatase; 9 fuctose 1,6-difosfaat aldolase; 10 triosefosfaat isomerase; 11 glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase en fosfoglycerate kinase; 12 fosfoglyceromutase en enolase; 13 pyruvaat kinase; 14 lactaat dehydrogenase; 15 pyruvaat-formaat lyase; 16 acetaldehyde dehydrogenase en alcohol dehydrogenase; 17 pyruvaat dehydrogenase; 18 acetaat kinase; 19 α -acetolactaat synthase; 20 α -acetolactaat decarboxylase; 21 2,3-butaandiol dehydrogenase (Wisselink et al., 2002).



Figuur 17: Heterofermentatieve metabolisme van MZB. 1 en 2 glucose en fructose permease; 3 glucokinase; 4 glucose-6-fosfaat dehydrogenase; 5 6-fosfogluconaat dehydrogenase; 6 epimerase; 7 fosphoketolase; 8 glucose fosfaat isomerase; 9 fructokinase; 10 mannitol dehydrogenase; 11 glyceraldehyde 3-fosfaat dehydrogenase en fosfoglyceraat kinase; 12 fosfoglyceromutase en enolase; 13 pyruvaat kinase; 14 lactaat dehydrogenase; 15 fosfaat acetyltransferase; 16 acetaldehyde dehydrogenase en alcohol dehydrogenase; 17 acetaat kinase (Wisselink et al., 2002).

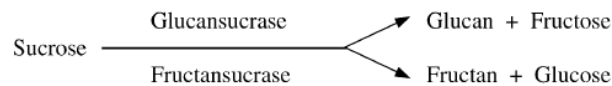


Figuur 18: Schematisch overzicht voor de alternatieve verwerking van pyruvaat tot andere eindproducten. De stippellijnen stellen een niet-enzymatische reactie voor. 1. diacetylsynthase; 2. Acetolactaat synthase; 3. Pyruvaat-formaat lyase; 4. Pyruvaat dehydrogenase; 5. Pyruvaat oxidase; 6. Acetaat kinase (Axelsson, 2004).

5.3. Exopolysacchariden

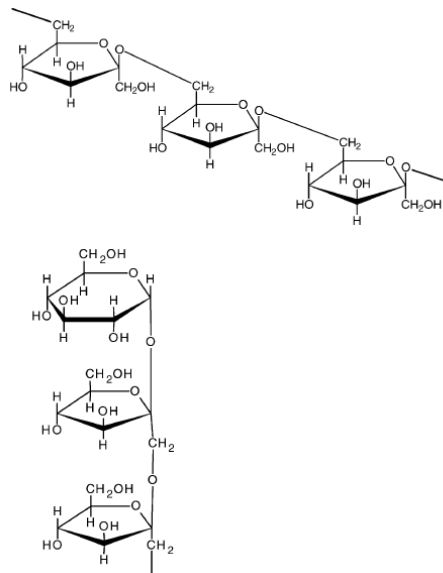
Verschillende MZB produceren extracellulaire polysacchariden. Deze kunnen capsulaire polysacchariden zijn (CPSs) en slijmachtige EPS. CPSs zijn aan de celwand gebonden via een covalente binding, terwijl de slijmachtige EPS vrijgegeven worden in het medium. (De Vuyst & Degeest, 1999; Torino, Font de Valdez, & Mozzi, 2015; Welman & Maddox, 2003). MZB zullen EPS gaan produceren als bescherming tegen ongunstige omgevingsomstandigheden (Lee et al., 2016; Mazzoli, Bosco, Mizrahi, Bayer, & Pessione, 2014). Ze beschermen tegen fagocytose, fagen, antibiotica of toxische componenten (bv metaalionen, ethanol, ...). Daarnaast kunnen ze ook dienst doen voor de adhesie aan oppervlaktes (biofilmvorming) of bij cellulaire herkenning, waar ze binden op lectine (De Vuyst & Degeest, 1999). In bier zullen EPS echter zorgen voor een verhoging van de viscositeit en slijmerige textuur, wat ongewenst is (Fraunhofer, 2018; Fraunhofer et al., 2018).

EPS kunnen onderverdeeld worden in twee klassen: de homopolysaccharides (HoPSs) en de heteropolysaccharides (HePSs). HoPS bestaan uit één type monosaccharide zoals glucose (α -glucan en β -glucan), fructose (levan en inuline) of galactose (polygalactaan). Deze polymeren worden extracellulair geproduceerd door sucrose te gebruiken als substraat. De reactie (figuur 19) zelf wordt gekatalyseerd door het enzyme transglycosylase of glycansucrase die glucansucrasen en fructansucrasen kunnen zijn (Lee et al., 2016; Monsan et al., 2001).



Figuur 19: Omzetting van sucrose tot de homopolysacchariden glucan of fructaan (Monsan et al., 2001).

HoPS bestaan uit één type monosaccharide. Wanneer dit type fructose is kan men spreken van twee grote subtypes: levan en inuline. Levan (figuur 20, boven) wordt geproduceerd door levansucrase (een fructansucrase). Dit enzym zal een β -2,6 binding veroorzaken tussen twee fructose moleculen, die typisch is voor levan (Monsan et al., 2001). Het enzym levansucrase wordt geproduceerd door MZB stammen die zich in de orale microbiota van de mens bevinden, zoals bijvoorbeeld *Streptococcus salivarius* en *Streptococcus mutans* (Giffard, Allen, Milward, Simpson, & Jacques, 1993; Shiroza & Kuramitsu, 1988). Het enzym kan gebonden zijn op de celwand, maar ook gesecreteerd worden in het medium (Milward & Jacques, 1990). Naast levan kan ook inuline (figuur 20, onder) gemaakt worden. Dit zijn fructo-olisacchariden die gebonden zijn via een β -2,1 binding. Ze worden onder andere gevormd door *S. mutans* stammen (Baird, Longyear, & Ellwood, 1973).



Figuur 20: structuren van fructanen met bovenaan levan en onderaan inuline (Monsan et al., 2001).

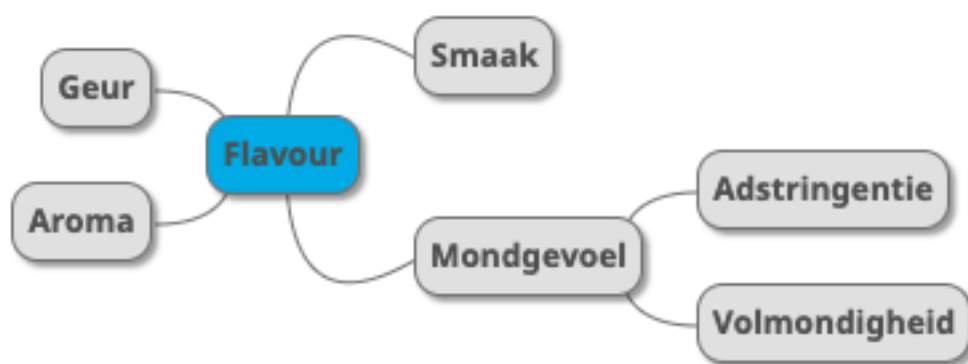
Naast fructose kan ook glucose het type monosaccharide zijn waaruit HoPS bestaat. Hierbij is het glucansucrase die de reactie katalyseert en glucanen produceert met α -1,6, α -1,3, α -1,4 en α -1,2 gelinkte glucose units (Monchois, Willemot, & Monsan, 1999; Sidebotham, 1974). Extracellulaire glucansucrases worden meestal geproduceerd door *Leuconostoc*, *Streptococcus* en *Lactobacillus spp.* (Mooser, 1992; Sidebotham, 1974).

Naast de HoPS zijn er ook HePS, dit zijn complexere polymeren die bestaan uit herhalende subunits. Deze subunits bestaan uit drie tot acht monosacchariden zoals glucose, galactose, xylose, mannose of arabinose. Naast deze monosacchariden kunnen ook occasioneel

aminozuren, polyolen of glucuronzuur aanwezig zijn (Lee et al., 2016; Mazzoli et al., 2014). De subunits van de HePS worden intracellulair aangemaakt, waarna ze geëxporteerd en gepolymeriseerd worden buiten de cel (Monsan et al., 2001; Torino et al., 2015). HePS worden onder andere aangemaakt door *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* susp. *cremoris*, *Lactobacillus casei* en *Lb. sake* (De Vuyst & Degeest, 1999)

6. Flavour

Een belangrijke term binnen de brouwerijwereld is de flavour van bier. De flavour is de som van alle componenten die geproduceerd worden in de verschillende stadia van het mout-, brouw- en fermentatieproces. Het is niet mogelijk om flavour te vertalen naar een Nederlandstalig woord, aangezien het verschillende termen omvat (figuur 21). Geur en Aroma zijn termen die te detecteren zijn via de neus, dus vluchtige componenten. Het verschil tussen de twee is dat geur een waarneming is rechtstreeks aan de neus, terwijl aroma retronasaal is. Dit betekent dat een vluchtige component binnenkomt via de mond, waar de temperatuur stijgt en de vluchtige component retronasaal naar de neus gaat. De termen mondgevoel en smaak zijn te detecteren via de mond en tong. Hier gaat het om niet-vluchtige componenten. Het mondgevoel kan nog opgesplitst worden in astringentie en volmondigheid. De volmondigheid is afhankelijk van eiwitten, terwijl de astringentie meer vertelt over een droog gevoel in de mond dat komt doordat deze gaat samentrekken (Rickus, 2016).



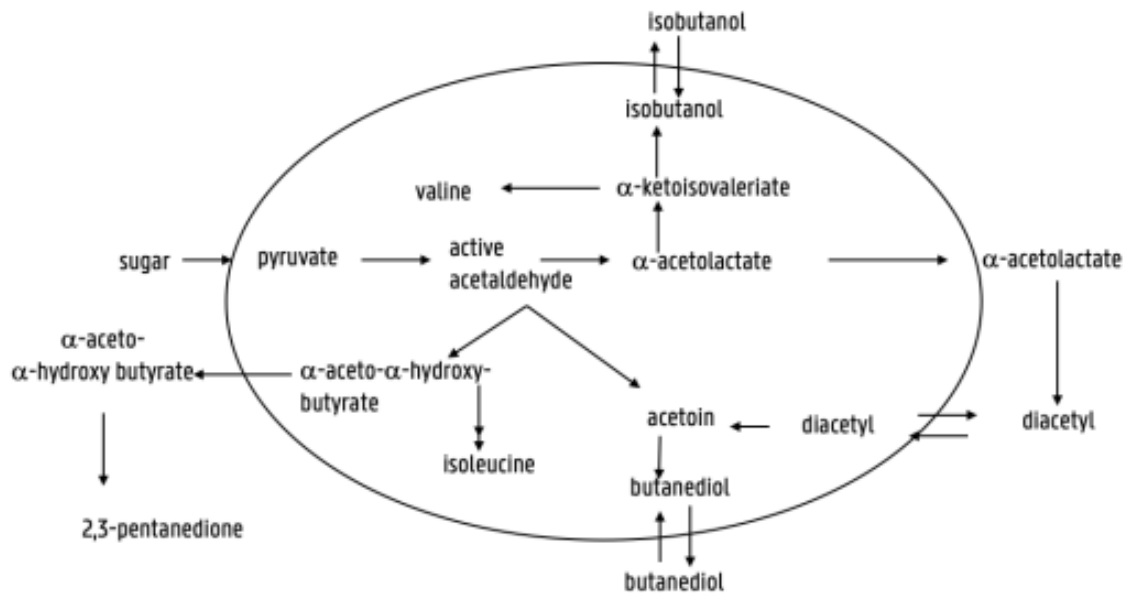
Figuur 21: Schematische opdeling van de term flavour.

6.1. Gisten

6.1.1. Vicinal diketonen (VDK's)

Er zijn twee belangrijke vicinal diketonen die een grote invloed hebben op het flavourprofiel van bier. Deze zijn 2,3-butaandion (diacetyl) en 2,3-pentaandion, van deze is vooral diacetyl de meest flavour actieve component. Diacetyl geeft het bier een boterachtige smaak wanneer het in concentraties hoger dan 0,1-0,15 ppm voorkomt. Deze smaak is dan ook ongewenst, ofwel een *off-flavour* (Wainwright, 1973).

In de gistcel zullen pyruvaat en α -oxobutyraat via enzymen omgezet worden tot resp. α -acetolactaat en α -acetohydroxybutyraat. Waarna deze componenten via passieve diffusie de cel verlaten. In het extracellulaire milieu zullen ze chemisch omgezet worden tot resp. diacetyl en 2,3-pentaandion, via een oxidatieve decarboxylatie (figuur 22). Op het einde van het fermentatieproces kan diacetyl terug opgenomen worden door de gist om gereduceerd te worden tot acetoïne en later naar 2,3-butaandiol (Brányik, Vicente, Dostálek, & Teixeira, 2008).



Figuur 22: Vorming van diacetyl en 2,3-pentaandion (Mosher & Trantham, 2017).

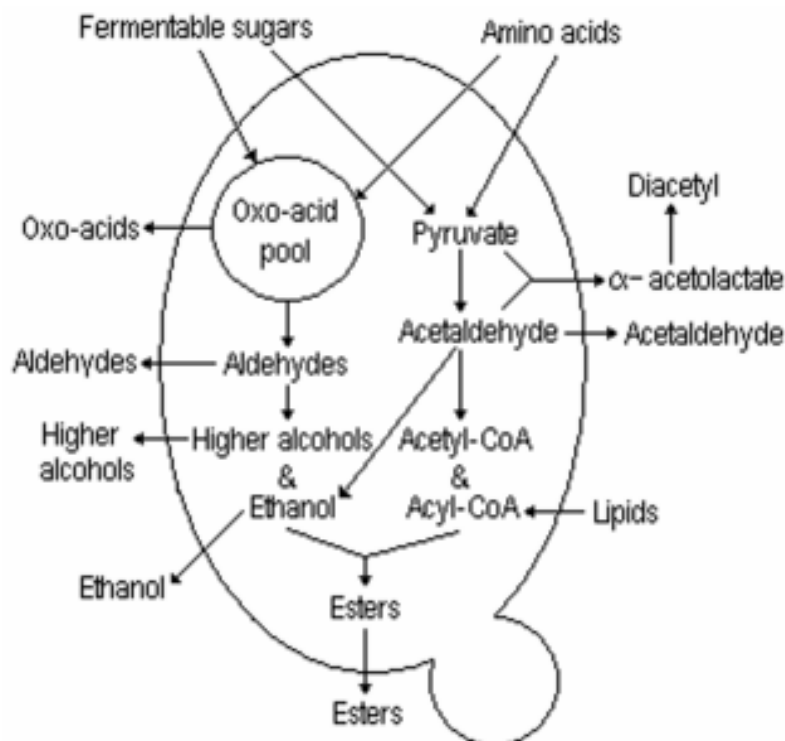
6.1.2. Hogere alcoholen

Tijdens de fermentatie worden naast ethanol nog verschillende andere hogere alcoholen gevormd. Deze kunnen bijvoorbeeld n-propanol, iso-butanol, isoamyl alcohol (2-methyl en 3-methyl butanol) zijn en dragen significant bij tot het flavourprofiel van bier. De hogere alcoholen kunnen een alcoholische of solventachtig aroma geven in hoge concentraties en zorgen voor een warm mondgevoel bij het drinken (Brányik et al., 2008).

De vorming van deze hogere alcoholen kan gebeuren via een anabolische of katabolische route (figuur 23). In de anabolische route zullen oxozuren, afkomstig uit het koolhydraatmetabolisme, gecarboxyleerd worden om aldehyden te vormen. Deze aldehyden kunnen dan gereduceerd worden tot hun overeenkomstige alcoholen. De benodigde oxozuren kunnen niet alleen afkomstig zijn van het koolhydraatmetabolisme, maar ook van aminozuren. Wanneer de hogere alcoholen ontstaan vanuit oxozuren, afkomstig van aminozuren, kan er gesproken worden over katabolische vorming (Brányik et al., 2008; Chen, 1978; Pires, Teixeira, Brányik, & Vicente, 2014). De finale concentratie van hogere alcoholen wordt daarom bepaald door de opname efficiëntie van de aminozuren en suikers en dus meer specifiek door de wortsamenstelling (Eden, Van Nederveelde, Drukker, Benvenisty, & Debourg, 2001; Kruger, Pickerell, & Axccl, 1992).

6.1.3. Esters

De vorming van esters door gisten is van groot belang, aangezien dit dikwijls gewenste componenten zijn in bier. Esters vertegenwoordigen een grote groep flavour actieve componenten, die bijdragen aan een fruitig aroma. De esters kunnen ingedeeld worden in twee groepen. De eerste groep bevat de acetaatesters zoals ethylacetaat (fruitig), isoamyl acetaat (banaan) en fenylethylacetaat (honing, appel). De tweede groep zijn de zogenaamde ethylesters zoals ethylcaproaat en ethyl caprylaat (beide een appelsmaak). De flavour actieve esters worden gevormd door acyltransferases die een condensatie tussen een acetyl- of acyl-CoA en hogere alcoholen of ethanol zullen katalyseren (figuur 23) (Brányik et al., 2008; Pires et al., 2014).



Figuur 23: Schematische weergave voor de vorming van de verschillende hoofdgroepen van flavour actieve componenten in bier, gevormd door gisten (Brányik et al., 2008).

6.1.4. Organische zuren

Een groot deel van de organische zuren in bier zijn afkomstig van het wort zelf, terwijl de rest wordt geproduceerd door het metabolisme van de gist (Brányik et al., 2008; Pires et al., 2014; Yamauchi et al., 1995). De organische zuren met een korte koolstofketen (pyruvaat, acetaat, lactaat, citraat, succinaat, malaat, oxozuren), zijn afkomstig uit de TCA cyclus of het katabolisme van aminozuren en dragen bij tot een daling van de pH tijdens de fermentatie (Brányik et al., 2008; Montanari, Perretti, Natella, Guidi, & Fantozzi, 1999). De organische zuren met een gemiddeld lange keten (C₆-C₁₂) zijn afkomstig van het vetzuuranabolisme onder anaerobe omstandigheden of door het vrijkomen bij het uiteenvallen van dode gistcellen. Deze zuren zijn vaak toxisch voor de gistcel, aangezien deze de celmembraan kunnen afbreken (Boulton & Quain, 2008; Verstrepen, Derdelinckx, Dufour, et al., 2003).

6.1.5. Aldehyden

Een laatste groep flavour actieve stoffen bij gisten, zijn de aldehyden. Er zijn verschillende aldehyden in wort die een flavour potentieel hebben (3-methyl butanal, 2-methyl butanal, hexanal, heptanal, ...). Deze worden aanzien als off-flavours en zijn vaak terug te vinden in laag-alcoholische bieren door de beperkte fermentatie (Brányik et al., 2008; Pires et al., 2014). Aldehyden in bier zullen vooral tijdens de wortproductie (mouten, *kilning*, *mashing*, koken) gevormd worden. In deze fase worden ze gevormd uit de oxozuren (figuur 24). De vorming gebeurt via enzymen die NADH- en NADPH-afhankelijk zijn, bijvoorbeeld: alcohol dehydrogenase isoenzymen, aldehyde dehydrogenase en aldo-keto reductase (Ford & Ellis, 2002; Ganzhorn, Green, Hershey, Gould, & Plapp, 1987; Van Nederveelde, Verlinden, Philipp, & Debourg, 1997).

6.2. Melkzuurbacteriën

6.2.1. Mannitol

Naast lactaat kunnen nog tal van andere bijproducten gevormd worden door melkzuurbacteriën. Één daarvan is mannitol. Mannitol is een polyol, ook wel suikeralcohol genoemd, dat zes koolstofatomen bevat. Het is het meest voorkomende suikeralcohol bij gisten, bacteriën, schimmels en algen en heeft een zoete smaak die ongeveer half zo zoet is als sucrose (Wisselink, Weusthuis, Eggink, Hugenholtz, & Grobbs, 2002). Mannitol wordt gezien als een molecule die m.o. kan beschermen tijdens perioden van stress (Chaturvedi, Bartiss, & Wong, 1997; Stoop, Williamson, & Pharr, 1996). Daarnaast zou mannitol een gezondheidsvoordeel geven aan voeding. De toevoeging van mannitol zou dus een extra voedingswaarde geven aan het product. Het wordt gezien als een voedzame zoetstof omdat het niet toxisch is, niet hygroscopisch en een kristallijne vorm heeft (Debord et al., 1987; Wisselink et al., 2002).

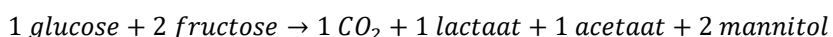
Zoals eerder vermeld kan mannitol een beschermende functie uitoefenen voor levende cellen. Het mechanisme is nog niet volledig gekend, maar er zijn wel drie hypothesen. De eerste hypothese stelt dat mannitol de turgordruk behoudt. Hierdoor zal bij een lage wateractiviteit, de cel mannitol accumuleren en bijgevolg water opnemen en de turgordruk herstellen (Jennings, 1985; Kets, 1997). Een tweede hypothese stelt dat mannitol de membraanstructuur zal stabiliseren bij een lage wateractiviteit (Leslie, Israeli, Lighthart, Crowe, & Crowe, 1995). Een derde hypothese veronderstelt dat mannitol zal interageren bij de oxidatieve schade die vrije zuurstofradicalen kunnen veroorzaken. Deze radicalen nemen toe bij lage wateractiviteit. Mannitol zal deze vrije zuurstofradicalen vangen en opruimen aangezien het in de chemie gekend is als een effectieve hydroxyl radicaal vanger (Chaturvedi et al., 1997; Chaturvedi, Wong, & Newman, 1996; Shen, Jensen, & Bohnert, 1997; Smirnoff & Cumbes, 1989). De toevoeging van mannitol kan gebeuren via directe toevoeging of door het gebruik van mannitol producerende m.o., zoals MZB. De productie is sterk afhankelijk van de koolhydraatfermentatie (Wisselink et al., 2002). Productie door m.o. (zoals MZB) heeft verschillende voordelen. Zo kunnen de m.o. direct toegevoegd worden aan het product als ze *food-grade* zijn. Daarnaast worden sommige MZB beschouwd als voordelig voor het maag-darmkanaal. Hierdoor moeten deze ook niet afgezonderd worden van het product na mannitolproductie (Wisselink et al., 2002).

Er zijn tot nu toe twee biosynthetische pathways te onderscheiden voor de productie van mannitol in MZB. Er is de pathway van de homolactische fermentatie en deze van de heterolactische fermentatie. Homofermentatieve MZB gebruiken koolhydraten enkel voor de productie van melkzuur. Hierdoor is de productie in hoge concentratie van andere producten (zoals mannitol) vaak enkel mogelijk als deze omzetting tot lactaat belemmerd wordt (Wisselink et al., 2002). Zo zijn er verschillende lactaat dehydrogenase-negatieve mutanten van *Lactobacillus plantarum* gevonden die de productie van mannitol stimuleren (Ferain, Schanck, & Delcour, 1996). De productie van hoge concentraties mannitol zal echter vooral plaatsvinden bij de heterofermentatieve MZB.

De homofermentatieve MZB gebruiken, zoals eerder vermeld, de glycolyse voor het fermenteren van hexosen (figuur 16). Tijdens deze fermentatie zal NAD⁺ gereduceerd worden tot NADH. Wanneer pyruvaat op het einde gereduceerd wordt tot melkzuur, zal NADH terug geoxideerd worden tot NAD⁺. Onder bepaalde omstandigheden zal de glycolyse niet enkel melkzuur produceren maar ook andere eindproducten zoals acetaat, ethanol, diacetyl, acetoin, 2,3-butaandiol en mannitol (Axelsson, 2004). De mannitol biosynthese bij homofermentatieve MZB start met het intermediair fructose 6-fosfaat. Dit zal omgezet worden tot mannitol-1-fosfaat via mannitol-1-fosfaat dehydrogenase. Mannitol-1-fosfaat wordt op zijn beurt

gedefosforyleerd tot mannitol door een fosfatase. De accumulatie van mannitol via deze omzetting zal vaak pas doorgaan als er een deficiëntie is in het lactaat dehydrogenase (Neves et al., 2000). Deze lactaat dehydrogenase-negatieve mutanten gebruiken de mannitol productie als een alternatieve pathway voor de regeneratie van NAD⁺ (Ferain et al., 1996). In tegenstelling tot de productie, is het verbruik van mannitol een meer frequent voorkomende pathway. Hierbij zal het binnengebracht worden via een fosfotransferase systeem, dat mannitol zal fosforyleren tot mannitol-1-fosfaat. Deze zal geoxideerd worden tot fructose-6-fosfaat via het mannitol 1-fosfaat dehydrogenase om via de glycolyse verder verwerkt te worden (Wisselink et al., 2002).

Naast de homofermentatieve MZB, zullen ook heterofermentatieve MZB mannitol kunnen produceren (figuur 17). Heterofermentatieve MZB zullen de fosfoketolase pathway gebruiken voor de fermentatie van hexosen. Dit komt omdat ze het enzym fructose 1,6-difosfaat aldolase missen. Onder anaerobe condities wordt glucose omgezet tot lactaat, ethanol en CO₂. (Axelsson, 2004; Cogan & Jordan, 1994). Wanneer acetyl fosfaat wordt omgezet in acetaat in plaats van ethanol, wordt er een extra ATP geproduceerd. Door de omzetting in acetaat, zal acetaldehyde niet optreden als elektronenacceptor bij de regeneratie van NAD⁺. Hierdoor moet een alternatieve elektronenacceptor gebruikt worden. Onder aerobe omstandigheden kan dit zuurstof zijn (Condon, 1987). Onder anaerobe omstandigheden zullen dit componenten zoals pyruvaat, glycerol en fructose zijn (Nuraida, Grigolava, Owens, & Campbell-Platt, 1992; Talarico, Axelsson, Novotny, Fiuzat, & Dobrogosz, 1990). Mannitol is het eindproduct dat gevormd wordt bij de regeneratie met fructose als alternatieve elektronenacceptor. Deze omzetting van fructose tot mannitol wordt gekatalyseerd door het mannitol dehydrogenase. Per mol glucose die gefermenteerd wordt, kan er ongeveer 2 mol fructose 100% omgezet worden in 2 mol mannitol volgens onderstaande reactie (Grobbe et al., 2001).

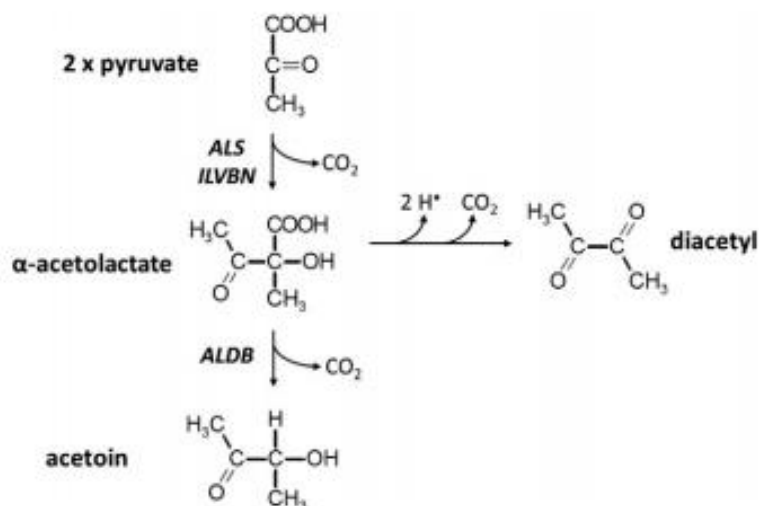


Als er enkel fructose aanwezig is om te fermenteren zal de glucose in bovenstaande reactie vervangen worden door een extra mol fructose. Hierdoor is fructose een fermenteerbaar suiker en een elektronenacceptor. Dit betekent dat er 1 mol fructose zal gefermenteerd worden, terwijl er 2 mol fructose wordt omgezet tot 2 mol mannitol. Hier is de conversie dus 67%. De reductie van fructose tot mannitol in heterofermentatieve MZB zal gekatalyseerd worden door een NADH-gelinkte mannitol dehydrogenase. Dit enzym zal uitsluitend fructose naar mannitol omzetten met een hoge activiteit. Daarnaast is het ook in staat om mannitol te oxideren tot fructose, zij het met een veel lagere activiteit (Sakai & Yamanaka, 1968). In tegenstelling tot homofermentatieve MZB, zullen de heterofermentatieve MZB geen mannitol fosfaat dehydrogenase activiteit vertonen. Ze hebben enkel een dehydrogenase activiteit die intracellulaire fructose of mannitol gebruikt als substraat (Grobbe et al., 2001).

6.2.2. Diacetyl

Diacetyl kan ook geproduceerd worden door MZB. De bekendste voorbeelden zijn *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* sp., *Streptococcus thermophilus* en *Leuconostoc mesenteroides* (Gupta, Prakash, & Gupta, 2015; Longo & Sanromán, 2006). Deze component geeft een boterige smaak aan het product en is ongewenst in bier (Gupta et al., 2015; Mazzoli et al., 2014; Papagianni, 2012). De pathway die hier naartoe leidt is weergegeven in figuur 24. Onder aerobe omstandigheden zal pyruvaat omgezet worden in acetaat en α-acetolactaat via acetolactaat synthase (ALS) of via acetohydroxyzuur synthase (ILVBN) (Gänzle & Follador, 2012; Mazzoli et al., 2014). α-acetolactaat is een onstabiel intermediair metaboliet die hierna kan gedecarboxyleerd worden tot acetoïne via α-acetolactaat decarboxylase. Een andere mogelijkheid is een decarboxylatie gevolgd door een oxidatie tot diacetyl. Diacetyl en acetoïne

zijn gerelateerde componenten, maar acetoïne wordt vaker teruggevonden en draagt ook minder bij tot de flavour. In het ideale scenario zal dus α -acetolactaat volledig omgezet worden in acetoïne. (Gupta et al., 2015; Longo & Sanromán, 2006). Diacetyl kan ook gevormd worden uit acetaldehyde door de omzetting via het enzym diacetylsynthase. De acetaldehyde wordt dan weer verkregen door de omzetting uit pyruvaat door middel van een pyruvaat decarboxylase (Gänzle & Follador, 2012).



Figuur 24: Diacetyl biosynthese in *Lactococcus lactis*. ALDB, α -acetolactaat decarboxylase; ALS, α -acetolactaat synthase; ILVNB, acetohydroxyzuur synthase (Mazzoli et al., 2014).

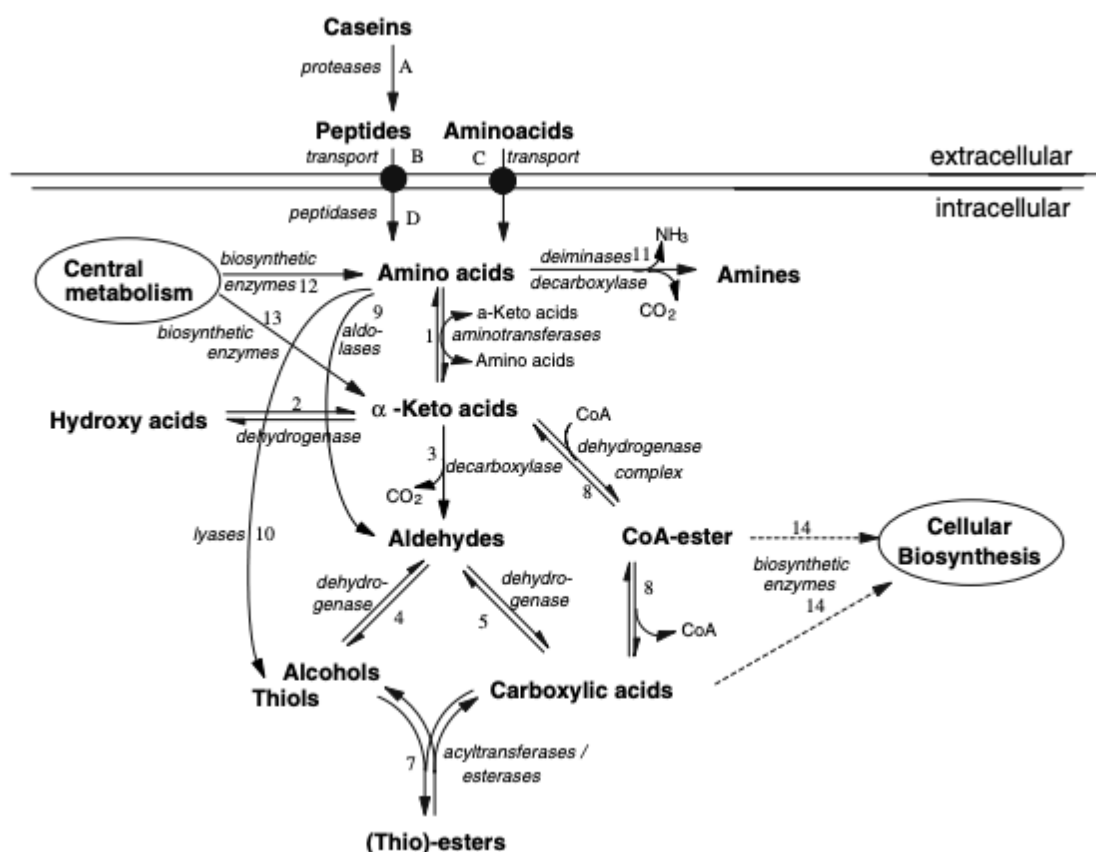
6.2.3. Esters

Tot nu toe is enkel gesproken over de pathway die de suikers verbruikt (glycolyse), maar er zijn ook pathways die vetten (lipolyse) en caseïne (proteolyse) verbruiken. Lipolyse zal leiden tot vrije vetzuren, die precursoren zijn voor flavourcomponenten zoals methylketonen, secundaire alcoholen, esters en lactonen. MZB zullen echter in het algemeen een kleine bijdrage hebben aan de lipolyse. De omzetting van eiwitten zoals caseïne of gluten daarentegen is een belangrijke pathway bij de vorming van flavourcomponenten door MZB. Zo zal de afbraak leiden tot kleine peptiden en vrije aminozuren. Verdere omzetting van deze aminozuren kan leiden tot de vorming van alcoholen, aldehydes, zuren, esters en zwavelcomponenten. In figuur 25 is een algemene figuur te vinden voor de vorming van verschillende flavourcomponenten uit aminozuren (G. Smit, Smit, & Engels, 2005).

Aminozuren zijn nodig voor de proteïnesynthese en bijhorende flavourcomponenten, maar niet alle MZB kunnen alle benodigde aminozuren produceren vanuit hun centrale metabolisme (Deguchi & Morishita, 1992; van Kranenburg et al., 2002). De meeste MZB zullen daarom aminozuren of kleine peptiden opnemen vanuit het extracellulaire milieu. Deze opname kan voorafgegaan worden door extracellulaire afbraak van proteïnen (figuur 25: A-D) door middel van proteolyse en peptidolyse (Konings, Poolman, Driessen, & Maloney, 1989; Smid, 1991). Intracellulair zal het grootste deel van de aminozuren eerst omgezet worden door aminotransferases (figuur 25: 3) tot de corresponderende α -ketozuren. Deze zijn de centrale intermediären en kunnen omgezet worden tot hydroxyzuren (figuur 25: 2), aldehyden (figuur 25: 3) en CoA-esters (figuur 25: 8) (Groot & de Bont, 1998; B. A. Smit et al., 2004). De gevormde aldehyden kunnen gehydrogeneerd of gedehydrogeneerd worden tot hun overeenkomstige alcoholen (figuur 25: 4) of organische zuren (figuur 25: 5), respectievelijk (Oku & Kaneda, 1988). Deze zijn dan weer de substraten voor de vorming van (thio)esters door

middel van esterasen en acyltransferasen (figuur 25: 7). Een voorbeeld van een ester die vaak geproduceerd wordt in MZB is ethylacetaat.

Ethylacetaat wordt gevormd door de verestering van een alcohol en azijnzuur. Wanneer ethylacetaat voorkomt in lage concentraties (<33 mg/l) zal dit een gewenste fruitige smaak geven aan het bier. Maar in hogere concentraties zal dit zorgen voor een solventachtig aroma, wat dan weer ongewenst is in bier (Bickham, 1997; K. J. Verstrepen, Derdelinckx, Dufour, et al., 2003). Naast deze manier van omzetting, kunnen de α -ketozen ook rechtstreeks omgezet worden tot alcoholen (figuur 25: 10). Deze omzetting werd het eerst teruggevonden in gisten, waar dit de Ehrlich pathway wordt genoemd (Hazelwood, Daran, Van Maris, Pronk, & Dickinson, 2008). Daarnaast kunnen de α -ketozen ook omgezet worden door lyasen (figuur 25: 10) die methionine kunnen omzetten tot methanethiol of door aldolassen (figuur 25: 9) die bv. threonine kan omzetten tot acetaldehyde (Alting, Engels, van Schalkwijk, & Exterkate, 1995; Dias & Weimer, 1998; Lees & Jago, 1976).



Figuur 25: Algemeen overzicht van de proteolyse van MZB die leidt tot verschillende flavourcomponenten (G. Smit et al., 2005).

6.2.1. Biogene amines

Een andere omzettingsroute is de deïminatie of decarboxylatie tot biogene amines (figuur 25: 11). Biogene amines (BA) zijn stoffen die van nature voorkomen in dierlijke en plantaardige producten. Deze zijn een bron van stikstof en precursoren voor de synthese van hormonen, nucleïnezuren en proteïnen. Bij mensen en dieren beïnvloeden deze stoffen verschillende uiteenlopende functies zoals de spijsvertering, de bloedsomloop en de ademhaling (Joosten, 1988; Leuschner, Kurihara, & Hammes, 1998). Wanneer kleine hoeveelheden van biogene amines terechtkomen in het menselijk lichaam, is er vaak geen probleem. Dit aangezien het maag-darmstelsel deze kan afbreken, via monoamine-oxidase (MAO) en diamine-oxidase

(DAO), tot organische zuren. Deze worden op hun beurt verder verwerkt via de glycolyse en de Krebs cyclus. Wanneer echter te grote hoeveelheden opgenomen worden in het lichaam, kunnen deze niet goed afgebroken worden, waardoor deze in de bloedbaan terechtkomen. Hier zullen deze tal van symptomen veroorzaken zoals hoofdpijn, misselijkheid en invloed vertonen op de bloeddruk (Karovičová & Kohajdová, 2005; Shalaby, 1996).

Het meest bekende biogene amine is histamine (Joosten, 1988; Karovičová & Kohajdová, 2005). Histamine ontstaat uit een decarboxylatie van histidine, door het histidine decarboxylase. Histamine kan gebruikt worden als twee soorten moleculen: enerzijds als neurotransmitter in het zenuwstelsel, waar het signalen doorgeeft via de synaptische spleet; anderzijds als signaalmolecule in het immuunsysteem, waar het een lokale ontstekingsreactie veroorzaakt en cellen van het immuunsysteem recruteert via chemotaxis.

Doelstelling

Melkzuurbacteriën hebben binnen de brouwerijwereld een negatief imago, aangezien deze vaak worden gezien als bierbedervers. Toch zijn er een aantal brouwers die gebruik maken van deze bacteriën tijdens het brouwproces, maar vaak is dit via spontane fermentatie. De bedoeling van deze masterproef is om met behulp van melkzuurbacteriën een nieuw, innovatief (laag-alcoholisch) bier te gaan ontwikkelen dat een lichtzure toets bevat. Tijdens de ontwikkeling van het bier zal geprobeerd worden om de fermentatie met melkzuurbacteriën onder gecontroleerde omstandigheden uit te voeren, zodat een meer consistent product geproduceerd kan worden dan bij een spontane fermentatie.

Om betere controle over het fermentatieproces te verkrijgen dienen een aantal zaken onderzocht te worden. Zo is het belangrijk om na te gaan hoe tolerant de melkzuurbacteriën zijn tegen ethanol, α -zuren en iso- α -zuren, de belangrijke componenten in bier die de groei van MZB kunnen inhiberen. In de literatuur kon niks teruggevonden worden over het effect van α -zuren op melkzuurbacteriën, daarom zal ook nagegaan worden of deze de groei van MZB inhiberen of niet. Stel dat geen of laag-tolerante melkzuurbacteriën worden gevonden, kan eventueel gekeken worden om deze meer tolerant te maken tegen deze componenten door adaptatie via *adaptive laboratory evolution*.

Na het vinden van geschikte melkzuurbacteriën, is het belangrijk om na te gaan hoe de fermentatie door MZB kan gecombineerd worden met de fermentatie door gist. Kunnen deze tegelijk gebeuren of zal één van beide niet of onvoldoende groeien door de competitie voor de nutriënten en/of inhibitie door fermentatieproducten? Hierbij kan dan worden nagegaan of het beter is om eerst de fermentatie door MZB uit te voeren of eerst door gist. Een bijkomende vraag kan zijn of de culturen kunnen gerecupereerd worden door gebruik te maken van een backslopping proces, om de kosten voor culturen te drukken.

Een laatste vraag die gesteld kan worden, is hoe de fermentatie van de MZB gestopt kan worden. Dit zou kunnen door het bier te pasteuriseren. Een andere mogelijkheid is dat de fermentatie door de MZB vanzelf stopt door de productie van ethanol door de gisten of door het toevoegen van andere inhiberende componenten, zoals α -zuren of iso- α -zuren.

Materiaal en methoden

1. Opzuivering van isolaten uit zuurdesems

Er werd eerst een stock aangemaakt met verschillende melkzuurbacteriën. Hiervoor werden melkzuurbacteriën, bekomen uit zuurdesems, opgezuiverd. Deze werden in het kader van een bachelorproef geïsoleerd uit zuurdesems op MRS (De Man, Rosa en Sharpe, Sigma-Aldrich) met 200 ppm cycloheximide. Voor de opzuivering werden de bacteriën uitgeplaat op MRS-agar (51 g/l MRS-broth, Sigma-Aldrich, en 13 g/l bacteriologische agar, Lab M limited). Dit medium werd dan geautoclaveerd, om nadien te laten afkoelen en platen te gieten. Uitplaten van de melkzuurbacteriën gebeurde door een entoog van de glycerol-stock van zuurdesems uit te strijken en te incuberen bij 30°C gedurende 3-5 dagen. Na de incubatietijd werden de kolonies overgeënt op nieuwe platen en opnieuw geïncubeerd tot zuivere kolonies werden verkregen. Zuivere kolonies werden in 1 mL glyceroloplossing (51 g/l MRS broth, 25% glycerol) overgebracht en bewaard bij -20°C. Daarnaast werd ook een entoog van het isolaat gesuspenderd in 300 µl Milli-Q water in een 2mL Eppendorf tube voor verdere staalvoorbereiding voor MALDI-TOF analyse (zie verder).

2. Opzuivering van isolaten uit starterculturen

Naast de stock uit zuurdesems werden ook commerciële starterculturen aangekocht om ook hieruit melkzuurbacteriën op te zuiveren. In tabel 1 is een overzicht te vinden van de aangekochte fermenten met de bijhorende, te verwachten, melkzuurbacteriën. Van de aangekochte starterculturen werd een deel opgelost in geautoclaveerde saline (0,9% NaCl). Daarna werden de starterculturen eerst geactiveerd door een entoog van de saline-suspensie over te brengen in proefbuizen met 10 mL MRS-broth (51 g/l MRS-broth, Sigma-aldrich). De geïnoculeerde MRS-broth werd geïncubeerd voor 24u bij 30°C, waarna de proefbuizen werden gevortext en een entoog werd uitgeplaat op MRS-agar. Het verdere opzuiveren verliep zoals eerder beschreven, tot zuivere kolonies werden bekomen om nadien de culturen in te vriezen en de staalvoorbereiding voor MALDI-TOF analyse uit te voeren.

Tabel 1: Aangekochte starterculturen met de te verwachten micro organismen.

Startercultuur	Code	Verwachte melkzuurbacteriën
Lactoferm® kaasferment	LK	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Lactoferm® zuurkoolferment	LZ	<i>Lactotoccus lactis</i> <i>Lactotoccus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Flora danica MSP (Chr. Hansen)	FD	<i>Leuconostoc</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Vinoferm® malocid	VM	<i>Oenococcus oeni</i> (volgens fiche <i>Leuconostoc oenos</i> , verouderde benaming)

3. Karakterisatie melkzuurbacteriën

Alvorens de opgezuiverde isolaten te gaan identificeren via MALDI-TOF MS, werden een aantal testen uitgevoerd om de isolaten te gaan karakteriseren. Op deze manier kon al een inschatting gemaakt worden of de isolaten melkzuurbacteriën waren en of deze homo- of heterofermentatief waren. De isolaten werden opnieuw uitgeplaat op MRS-agar en geïncubeerd (30°C gedurende 3-5 dagen). Hierna werden een kaliumhydroxide- katalase, EPS- en CO₂-productietest uitgevoerd.

3.1. Gram positief of negatief

MZB zijn grampositieve bacteriën, om dit na te gaan werd gebruik gemaakt van de kaliumhydroxide-test. Kaliumhydroxide zal de dunne laag peptidoglycaan in de celmembraan van Gram negatieve bacteriën oplossen. Hierdoor zal het membraan lyseren en komt het DNA vrij. Dit vrijgekomen DNA zal te zien zijn als draadachtige structuren in de oplossing. Gram positieve bacteriën bevatten een dikkere peptidoglycaanlaag in hun membraanstructuur, waardoor het membraan niet zal lyseren en een negatief resultaat wordt waargenomen. De test werd uitgevoerd door een kolonie op te pikken en te suspenderen in een druppel 3% KOH-oplossing, waarbij gekeken werd of er draadachtige DNA-structuren te zien waren.

3.2. Aanwezigheid van katalase

Via een katalase-test werd nagegaan of de isolaten het enzym katalase bezitten of niet. Katalase zal H₂O₂ omzetten in water en zuurstofgas, waarbij het zuurstofgas een bruisend effect zal geven. De test werd uitgevoerd door een kolonie van de isolaten op te lossen in een druppel H₂O₂ en te kijken of er bruisend effect te zien was of niet. Melkzuurbacteriën zijn katalase-negatief en zullen dus geen bruisende oplossing geven.

3.3. Productie van exopolysacchariden

Sommige MZB kunnen soms sucrose gebruiken voor de productie van exopolysacchariden. Om na te gaan als de isolaten exopolysacchariden produceerden, werden deze uitgeplaat op MRS-agar met sucrose (51 g/l MRS broth, 12 g/l bacteriologische agar en 10 g/l sucrose). Wanneer slijmachtige kolonies te zien waren op de MRS + sucrose platen, was dit een indicatie dat dit een EPS-producerend isolaat was.

3.4. CO₂-productie

Om na te gaan of de isolaten homo- of heterofermentatief zijn, werd een CO₂-productie test uitgevoerd. Hierbij werd een isolaat geënt in een proefbuis met 10 mL geautoclaveerde MRS-broth, met een omgekeerd geplaatst Durham-buisje op de bodem. Een heterofermentatief m.o. zal CO₂ produceren waardoor dit Durham-buisje zal opstijgen in de MRS broth, terwijl dit bij een homofermentatief m.o. gewoon blijft liggen op de bodem.

4. Identificatie van isolaten via MALDI-TOF MS

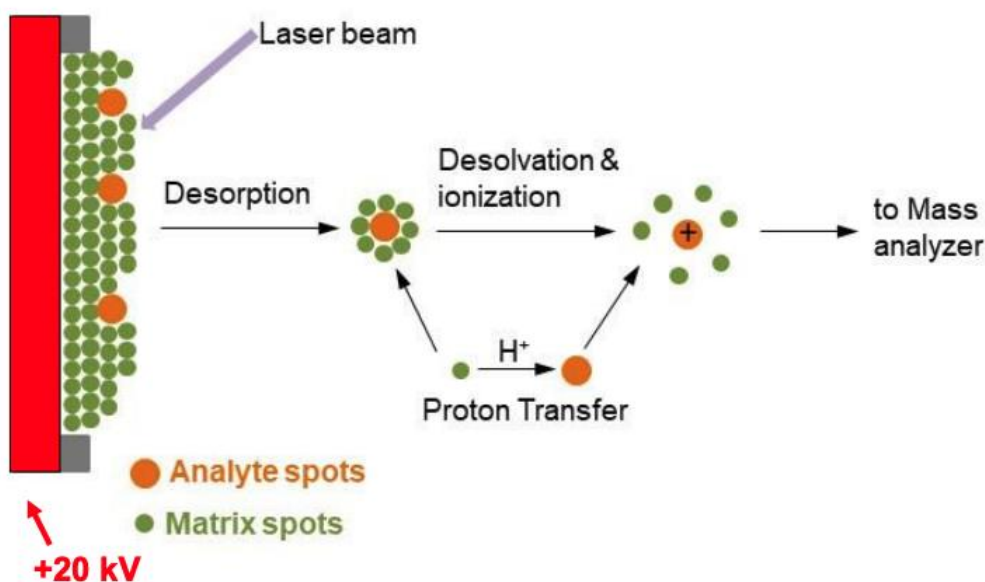
4.1. Principe

Voor de identificatie van de melkzuurbacteriën werd gebruik gemaakt van een MALDI-TOF MS analyse (*matrix-assisted-laser-desorption-ionisation, time-of-flight mass-spectrometrie*). Hiervoor werd samengewerkt met het labo microbiologie (LM), van de vakgroep biochemie en microbiologie (WE10) van de universiteit Gent.

Het principe van massaspectrometrie is het produceren, scheiden en detecteren van gasvormige ionen (Jurinke, Oeth, & van den Boom, 2004). Van deze ionen kan dan de massa-lading ratio

(m/z) gedetecteerd worden. MALDI-TOF MS kan gebruikt worden voor het opstellen van een profiel van de bacteriële eiwitten, bekomen uit cel-extracten. Dit profiel kan dan vergeleken worden met profielen van standaarden uit een database om het staal te identificeren. (Carbonnelle et al., 2011)

In MALDI-TOF-MS wordt het staal in een kristallijne structuur van matrixcomponenten ingebed en op een plaat geladen (Jurinke et al., 2004). Door middel van een laser wordt de plaat bestraald. De energie van de laserstraal zal opgenomen worden door de matrixmoleculen, waardoor deze kristallen zullen vibreren en desintegreren. Hierdoor zullen deze loskomen van de plaat en ioniseren. Daarnaast zullen ook neutrale matrixmoleculen en analietmoleculen vrijgesteld worden. De geïoniseerde matrixmoleculen zullen de neutrale analietmoleculen omgeven en via protontransfer wordt het analiet geïoniseerd. Door het aanleggen van een elektrisch potentiaalverschil, zullen de positieve ionen versneld worden naar de massaspectrometer. Deze methode is te zien in figuur 26.



Figuur 26: Schematische voorstelling van matrix-assisted-laser-desorption-ionisation (Jindrich, 2019).

De *time-of-flight* (TOF) massaspectrometer wordt gekarakteriseerd door een eenvoudig werkingsprincipe. De ionen, geproduceerd via MALDI en versneld via het aangelegde potentiaalverschil (ΔV of V), bezitten een bepaalde kinetische energie. Deze wordt gegeven door:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = qV$$

De versnelde ionen komen in een veldvrije zone in een rechte buis terecht. De snelheid waarmee deze in de veldvrije zone bewegen, wordt gegeven door:

$$v = \sqrt{2 \frac{qV}{m}}$$

De tijd die de ionen nodig hebben om doorheen de buis, met lengte L , te bewegen en de detector te bereiken wordt vervolgens gegeven door:

$$t = \frac{L}{v} = \frac{L\sqrt{m}}{\sqrt{2qV}}$$

Hierdoor worden de ionen, met TOF-MS, volgens hun massa over lading gescheiden in tijd. Door het continu detecteren van ionen, met de detector, wordt een massaspectrum verkregen.

4.2. Methode

De stalen werden opgelost in 300 µl Milli-Q water in een 2 mL Eppendorf tube (eerder vermeld bij de opzuivering van zuurdesems en starterculturen), waarna vortexen volgde tot een homogene suspensie werd verkregen. Om vroegtijdige lyse van de cel te voorkomen, wordt aangeraden om maximum dertig staalnames per keer te nemen. Na vortexen werd, aan ieder staal, 900 µl ethanol absoluut toegevoegd en gecentrifugeerd (14 000 rpm, 3 minuten bij 4°C), waardoor een celpellet werd gevormd. Dit werd bewaard op -20°C tot de uiteindelijke analyse. Hiervoor werd, na centrifugatie, het supernatans verwijderd en de centrifugatiestap herhaald zodat de ethanol volledig verwijderd was (eventueel de pellet nog laten drogen aan de lucht). Vervolgens werd 40 µl 70 % mierenzuur toegevoegd aan de pellet en opnieuw gevortext. Na vortexen volgde de toevoeging van 40 µl acetonitrille, waarna opnieuw werd gevortext en gecentrifugeerd (14 000 rpm, 2 minuten bij 4°C). Na centrifugatie werd 40 µl van de bovenste laag van het supernatans gepipetteerd in een nieuwe Eppendorf tube.

Er werd matrix-oplossing (α -cyaan-4-hydroxycinnaminezuur) gemaakt door 2,5 mg op te lossen in 250 µl solvent (Acetonitrile:Water:Trifluoro azijnzuur; 50:47,2:2,5), te vortexen en te verwarmen bij 37°C. Van ieder peptide-extract en de kalibratiestandaard (*bacterial test standard*, BTS) werd 1 µl gespot op de target plat. Na het drogen van deze spots, werd 1 µl van de matrix-oplossing gespot op de gedroogde spots en opnieuw gedroogd. Daarnaast werd ook 1 µl van de matrixoplossing apart gespot als negatieve controle. Ieder isolaat werd in duplicaat op de plaat gespot, net zoals de kalibratiestandaard en de negatieve controle.

De plaat werd in de *docking tray* van het Bruker Microflex™ LT geplaatst. Na een geslaagde kalibratie van het systeem werd de analyse van de eiwitextracten gestart.

4.3. Interpretatie van de resultaten

Aan de hand van binnenshuis ontwikkelde software kunnen de isolaten geclusterd worden, op basis van hun peptide *fingerprints* (Dumolin et al., 2019). Hierbij worden de bekomen MALDI-TOF-MS spectra vergeleken met commerciële en binnenshuis ontwikkelde databases, zodat deze worden geïdentificeerd. Ieder isolaat dat ongeïdentificeerd blijft op basis van de twee databases, kan nog onderworpen worden aan een analyse van de rRNA-genen en de eiwit-coderende genen, zodat toch een accurate identificatie kan volgen (Spitaels et al., 2015)

De analyse geeft ieder staal een Bruker Microflex™ score, die een indicatie is voor de betrouwbaarheid van de identificatie. Wanneer de score zich in de range 2,00 - 3,00 bevindt, behoort deze identificatie tot de A-categorie. Dit betekent dat de identificatie een hoge betrouwbaarheid heeft. Als de score zich in de range 1,70 – 1,99 bevindt (B-categorie), heeft de identificatie een lage betrouwbaarheid. Wanneer de score onder de 1,70 ligt (categorie C), is geen identificatie mogelijk.

5. Groei van melkzuurbacteriën en/of gist in wort

Er werd nagegaan of de melkzuurbacteriën goed groeiden in het wort en daarbij ook melkzuur produceerden. Hiervoor werd wort gemaakt (75 g gedroogd wortextract werd hiervoor opgelost in 1L water). Hiervan werd 200 mL verdeeld in Schottflessen van 250 mL en geautoclaveerd. Na autoclaveren werd geïnoculeerd. Er werden 4 soorten fermentaties opgevolgd. (i) Een

fermentatie waarbij 100 µl van de bacteriële suspensie (10^6 CFU/mL) met code 1D2 (*Lactobacillus brevis*) werd geïnoculeerd; (ii) een fermentatie met inoculatie van 100 µl gistsuspensie (Fermentis SafAle T-58, opgelost in 0,9% saline); (iii) een fermentatie met inoculatie van 50 µl bacteriële suspensie en 50 µl gistsuspensie; en (iv) een fermentatie met inoculatie van 100 µl steriele saline (negatieve controle). De fermentatieproef werd opgevolgd gedurende 4 dagen.

Om de fermentatieproef op te volgen werden (op dag 0, 1, 2 en 4) stalen uitgeplaat op MRS-agar en YPD (*yeast extract peptone dextrose*)-agar (20g glucose, 13g agar, 5g gistextract en 10g pepton in 1L water). Hiervoor werd een verdunningsreeks van de stalen aangelegd met geautoclaveerde saline-oplossing (0,9% NaCl). Van deze verdunningsreeks werd telkens 100 µl van de suspensie uitgeplaat om, na incubatie van 3-5 dagen op 30°C, het aantal kolonievormende eenheden te tellen. Naast het uitplaten werden ook het ethanolgehalte, de densiteit en de pH bepaald.

6. Groei van melkzuurbacteriën in wort

Bij een tweede experiment werd nagegaan of de stock melkzuurbacteriën nog levend was. Hierbij werd het fermentatieproces opgevolgd aan de hand van de pH. Hiervoor werden de isolaten *Lactobacillus brevis* (1D2), *Lactobacillus brevis* (1P4-a), *Pediococcus pentosaceus* (1T2), *Lactobacillus plantarum* (1T6-a), *Pediococcus pentosaceus* (2 Gerst B5C), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (FD-a), *Lactococcus lactis* (LK-a) en *Lactobacillus plantarum* (VM-a) gebruikt. Voor ieder isolaat werd een Schott fles met 200 mL wort aangemaakt die werd geïnoculeerd met 100 µl inoculum met 10^6 CFU/mL. Het fermentatieproces werd gedurende 6 dagen opgevolgd door 10 mL vanuit de Schott fles steriel over te gieten in een FalcontTM buisje en van dit staal de pH te bepalen via een pH-meter. Er werd ook een negatieve controle opgevolgd: Schott fles met wort, waaraan 100 µl 0,9% steriele saline werd toegevoegd.

7. Groei van melkzuurbacteriën in wort met verschillende ethanolconcentraties

Aangezien MZB kunnen afsterven door ethanol, werd de tolerantie van de bekomen isolaten nagegaan. Hiervoor werd gebruikt gemaakt van een wort met verschillende concentraties ethanol. Na incubatie bij deze verschillende ethanolconcentraties, kon de tolerantie tegen ethanol worden nagegaan.

Om een hogere *throughput* te kunnen genereren, werden de fermentaties uitgevoerd in een 96-well plaat. Er werd opnieuw wort (75 g/l wortextract in water) gemaakt in Schott flessen en geautoclaveerd. Daarna werd het medium geïnoculeerd met 100 µl bacteriële suspensie met 10^6 CFU/mL. In een eerste experiment hiervoor werden *Lactobacillus brevis* (1D2) en *Lactococcus lactis* (LK-a) getest. Vanuit dit medium werd een bepaald volume overgebracht in een welletje van de 96-well plaat. Daarnaast werd ook een bepaalde concentratie steriel gefilterde ethanol toegevoegd, hiervoor werden stockoplossingen met verschillende concentraties ethanol gemaakt. De stockoplossing waren: (i) 100% ethanol (5 mL), (ii) 50% ethanol (2,50 mL water met 2,50 mL 100% ethanol), (iii) 25% ethanol (3,75 mL water met 1,25 mL 100% ethanol) en (iv) 10% ethanol (4,50 mL water met 0,50 mL 100% ethanol). De respectievelijke hoeveelheden wort en ethanol die werden toegevoegd, zijn te vinden in tabel 2.

Tabel 2: Samenstelling van de media om de tolerantie van melkzuurbacteriën tegen ethanol na te gaan. Wort (75g/l wortextract) bevatte ethanolconcentraties (uitgedrukt in %v/v).

Finale ethanolconcentratie	0%	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	2,5%	3,0%	3,5%
Wort	250 µl	237,5µl	225 µl	235 µl	230 µl	225 µl	220 µl	215 µl
Ethanol oplossing	/	12,5µl 10%	25 µl 10%	15 µl 25%	20 µl 25%	25 µl 25%	30 µl 25%	35 µl 25%
Finale ethanolconcentratie	4,0%	4,5%	5,0%	5,5%	6,0%	6,5%	7,0%	7,5%
Wort	210 µl	227,5µl	225 µl	222,5µl	220 µl	217,5µl	232,5µl	231,25µl
Ethanol oplossing	40 µl 25%	22,5 µl 50%	25 µl 50%	27,5 µl 50%	30 µl 50%	32,5 µl 50%	17,5 µl 100%	18,75µl 100%

De groei van de isolaten werd opgevolgd door gedurende 7 dagen, elke dag de absorbantie te meten bij 600 nm met behulp van een spectrofotometer.

8. Ethanol-, densiteits- en pH-bepaling

Om het ethanolgehalte, de densiteit en de pH van het bier te gaan bepalen, werd gebruik gemaakt van het Anton Paar *Alcolyzer beer analyzing system*. Hierbij wordt celvrij supernatans geanalyseerd door het toestel. Om het celvrij supernatans te bekomen werd het staal in een Falcon™ tube overgebracht. De verschillende stalen werden afgecentrifugeerd (14 000 rpm, gedurende 5 minuten) en het supernatans overgeheveld in een AntonPaar-buisje. Na kalibratie van het toestel, konden de verschillende stalen geanalyseerd worden.

9. pH-bepaling

De pH werd bepaald via de pH-meter. Dit gebeurt door het potentiaalverschil te meten tussen een glaselektrode en een zilver/zilverchloride-elektrode (referentie-elektrode). De pH-meter dient eerst gekalibreerd te worden, waarna het staal kan gemeten worden door de elektrode in de te meten oplossing te brengen.

10. OD600 via spectrofotometrie

Om de groei van de isolaten op te volgen werd gebruik gemaakt van spectrofotometrie. Hierbij werd de absorbantie gemeten bij 600nm, waarbij de troebelheid in verband staat met het aantal cellen (in dit geval bacteriële cellen). Hierdoor krijgt men een indicatie of het aantal cellen toeneemt of afneemt, het specifieke aantal aanwezige cellen kan echter niet bepaald worden. De 96-well plaat werd hiervoor in de spectrofotometer geplaatst en geschud, alvorens de meting uit te voeren.

Resultaten en discussie

1. Karakterisatie melkzuurbacteriën

In tabel 3 zijn de resultaten te vinden van de karakterisatie en identificatie van de isolaten. Isolaat 2MoutA5E vertoonde geen groei. Deze werd opnieuw uitgeplaat en geïncubeerd, maar gaf opnieuw geen groei op de MRS-agar platen. Er werden dan ook geen verdere testen meer op uitgevoerd. Daarnaast vertoonde 1P4 nog verschillende soorten kolonies, deze werden opnieuw overgeplaat, waardoor een a en b variant ontstond. Deze twee varianten werden nadien onderworpen aan de karakterisatie en identificatie. De kaliumhydroxide-test gaf bij geen enkele opgezuiverde cultuur een reactie, dit wijst op de aanwezigheid van enkel Gram-positieve bacteriën. Bij de katalase-test waren ook alle culturen negatief. Enkel isolaat 2Tarwe5BA-a vertoonde slijmproductie op MRS + sucrose. Er werd daardoor besloten om niet verder te werken met dit isolaat, omdat de productie van EPS kan leiden tot een verhoogde viscositeit en vertroebeling van het bier, wat ongewenst is (Fraunhofer, 2018; Fraunhofer et al., 2018). Tenslotte werden zowel homo-als heterofermentatieve melkzuurbacteriën gevonden. De resultaten van de selectietesten gaven een indicatie dat alle isolaten melkzuurbacteriën waren (Axelsson, 2004).

De karakterisatie van de starterculturen zouden later uitgevoerd worden, maar door de Coronacrisis was dit niet meer mogelijk.

2. Identificatie van isolaten via MALDI-TOF MS

Na de MALDI-TOF analyse konden de isolaten geïdentificeerd worden (tabel 3). Voor isolaten 1G2 (*Pediococcus pentosaceus*) en 2Tarwe5BA-a (*Leuconostoc citreum*) waren de Brucker microflex™ scores laag (<2,00; categorie B), waardoor de betrouwbaarheid van deze identificaties lager lag. De opzuivering en identificatie van deze isolaten zou moeten opnieuw uitgevoerd worden. Er werd echter eerder al gezien dat 2Tarwe5BA-a exopolysacchariden produceert (ongewenst in bier), waardoor besloten werd om de opzuivering en identificatie van dit isolaat niet meer opnieuw te doen. Voor FD-b werd geen overeenkomend piekenpatroon gevonden en dus ook geen score bekomen. Ook hiervoor moest de opzuivering en de identificatie opnieuw uitgevoerd worden. De opzuivering werd opnieuw gedaan, maar identificatie was niet mogelijk door de Coronacrisis.

Bij de identificatie werd een merkwaardig resultaat bekomen voor VM-a en VM-b (Vinoferm® malocid). De MALDI-TOF MS analyse gaf aan dat een *Lactobacillus plantarum* species werd geïdentificeerd. Dit is toch een opmerkelijk resultaat aangezien deze startercultuur enkel *Oenococcus oeni* species zou bevatten volgens het certificaat van Vinoferm® (*Leuconostoc oenos*, verouderde benaming op het certificaat). De Brucker microflex™ scores voor deze isolaten waren echter hoog, waardoor een betrouwbare identificatie werd verkregen en het resultaat als correct werd beschouwd.

Na identificatie konden de resultaten van de karakterisatie beter geanalyseerd worden. Op basis van gegevens, bekomen uit de literatuur (Axelsson, 2004), werd vastgesteld dat de karakterisatiereultaten overeen kwamen met de identificatie. Enkel voor 2MOUTB5G (*Pediococcus pentosaceus*) was vastgesteld via de testen dat dit een heterofermentatieve MZB was, terwijl het species homofermentatief is volgens de literatuur.

Tabel 3: Identificatieresultaten van de isolaten, opgezuiverd uit de zuurdesems en de starterculturen, via MALDI-TOF MS. De exacte Brucker microflex™ scores, per isolaat, zijn te vinden in de bijlage (- = negatief, + = positief).

Code	Identificatieresultaat	Opmerkingen MALDI-TOF-MS	KOH	katalase	EPS	CO2-test
1B1	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
1B2	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
1D2	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
1G2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	score <2 maar aanvaardbaar.	-	-	-	-
1M1	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
1M5	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
1P2	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
1P4-a	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
1P4-b	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
1T2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	-	-
1T6-a	<i>Lactobacillus plantarum</i>		-	-	-	-
1T6-b	<i>Lactobacillus plantarum</i>		-	-	-	-
2GerstB5C	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	-	-
2GeuzeC1B	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	-	-
2MoutA5D	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
2MOUTA5F	<i>Lactobacillus brevis</i>		-	-	-	+
2MoutB5G	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	-	+
2ROD4BD	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	-	-
2RODB5A	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	-	-
2Tarwe5BA-a	<i>Leuconostoc citreum</i>	score <2, maar aanvaardbaar.	-	-	+	+
2Tarwe5BA-b	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		-	-	-	-
FD-a	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>					
FD-b	/	Geen score				
FD-c	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>					
LK-a	<i>Lactococcus lactis</i>					
LZ-b	<i>Lactococcus lactis</i>					
LZ-c	<i>Lactococcus lactis</i> subp. <i>lactis</i>					
VM-a	<i>Lactobacillus plantarum</i>					
VM-b	<i>Lactobacillus plantarum</i>					

3. Groei van melkzuurbacteriën en/of gist in wort

Na identificatie werd onderzocht wat het effect van inoculatie van wort, met melkzuurbacteriën, voor gevolgen kan hebben op de groei en fermentatie van gist. Dit werd bestudeerd door wort te inoculeren met enkel gist; enkel melkzuurbacteriën; en gist + melkzuurbacteriën, hierbij werd de pH en alcoholvorming opgevolgd gedurende 4 dagen.

Bij dag 4 waren geen resultaten van het uitplaten omdat er een overgroeiing was, te wijten aan te weinig verdunnen van het staal. Daarnaast werden ook enkele problemen ondervonden met het toestel van de ethanol-, densiteit- en pH-bepaling, waardoor er meetwaarden ontbraken met betrekking tot extractgehalte. Er werd dan ook vooral gelet op de evolutie van de pH en het alcoholgehalte bij de verwerking van deze resultaten. Deze evoluties werden ook uitgezet in twee grafieken (figuur 27).

De fermentatie met enkel gist vertoonde een stijging in het aantal kolonies op de platen. Dit op zowel MRS- als YPD-agar (figuur 27). Bij de resultaten van de ethanol-, densiteit- en pH-analyse, werd een stijging waargenomen van het alcoholgehalte (%v/v) en een daling van de pH (figuur 27).

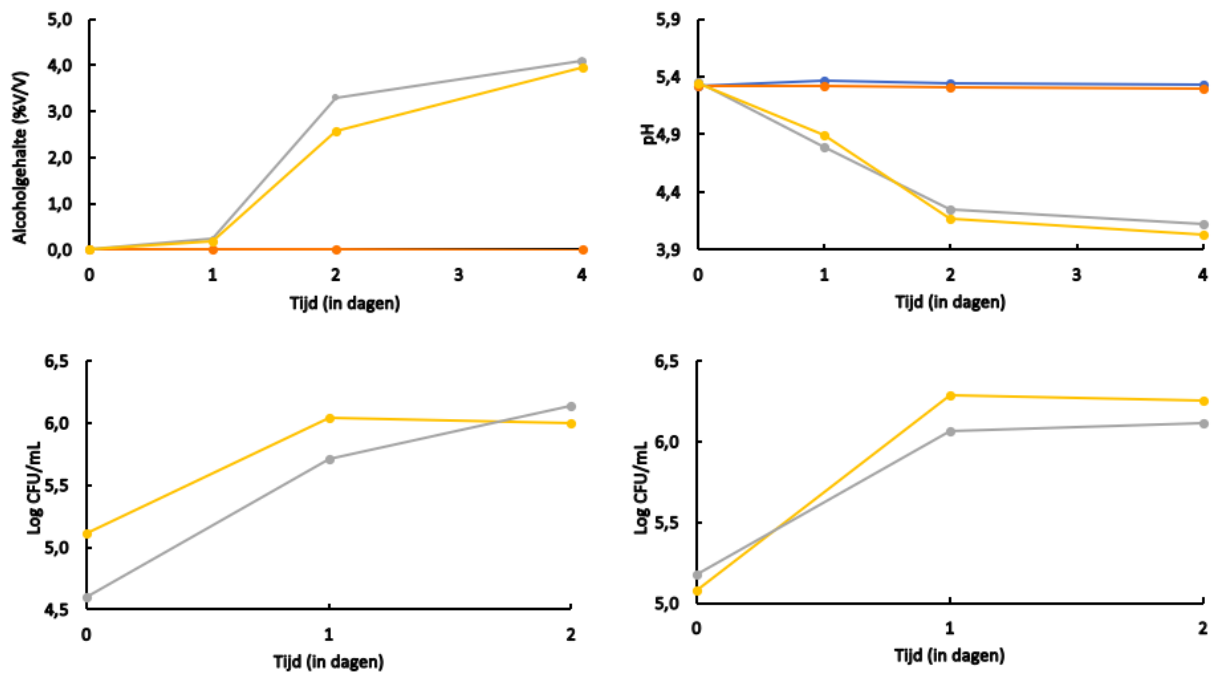
De fermentatie met de melkzuurbacteriën en gist vertoonde een stijging in het aantal kolonies op beide agarplaten (figuur 27). Opvallend was wel dat er geen kolonies van melkzuurbacteriën te zien waren, maar enkel gisten. Bij de resultaten van de analyse met het AntonPaar-toestel werd ook hier een daling van de pH gezien en een stijging van het alcoholgehalte (figuur 27). Deze vertoonden een gelijkaardige evolutie als deze voor de fermentatie met enkel gist.

Bij de fermentatie met inoculatie van enkel melkzuurbacteriën was geen groei te zien op de platen. De ethanol-, densiteits- en pH-analyse toonde aan dat er geen stijging te zien was bij het alcoholgehalte en geen verandering van de pH (figuur 27).

Bij de controle was telkens voor alle verdunning en alle dagen geen groei waar te nemen. Er was ook geen pH-verandering of verandering in het alcoholgehalte waar te nemen (figuur 27).

Uit de resultaten kan besloten worden dat de gisten groei vertoonden, dit was te concluderen uit de uitplantingen van beide fermentaties waar gist werd gebruikt. Daarnaast was er ook sprake van vergisting aangezien een pH-daling en stijging van het alcoholgehalte waargenomen werd voor beide fermentaties met gist.

De belangrijkste conclusie was echter dat er geen groei kon gezien worden van de melkzuurbacteriën. Dit was te zien door een gebrek aan groei van de MZB bij het uitplaten voor zowel de fermentatie met MZB, als de fermentatie met MZB en gist. Daarnaast was er ook geen pH verandering te zien voor de fermentatie met enkel MZB. De fermentatie met MZB en gist vertoonde ook geen extra daling van de pH, wat verwacht werd aangezien MZB melkzuur zullen produceren. Door het gebrek aan groei, was het noodzakelijk om na te gaan of de MZB-stock nog levend en actief was.



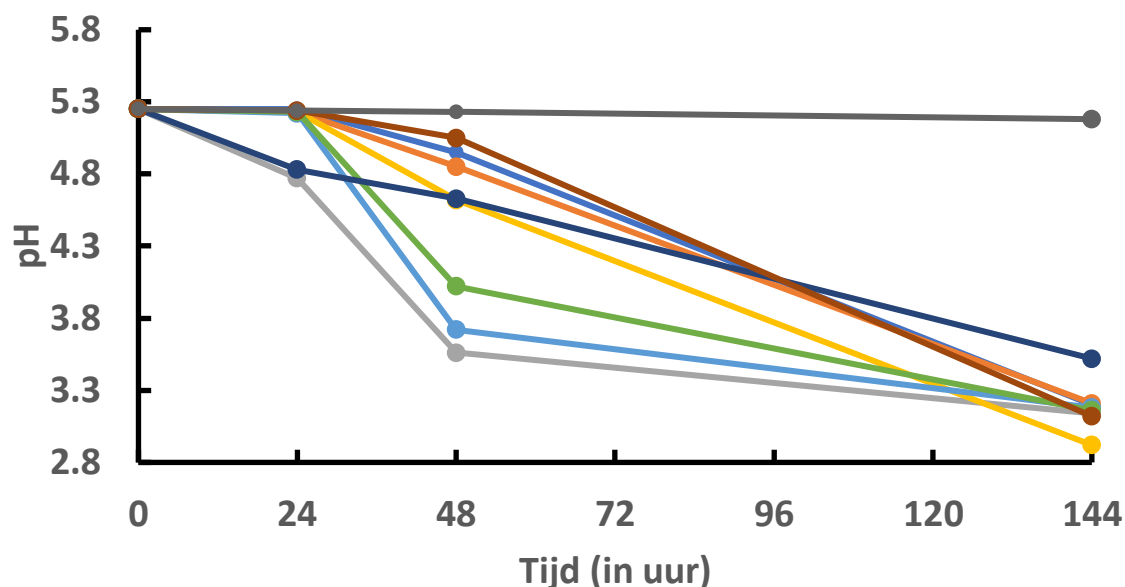
Figuur 27: Grafische voorstelling van de uitplating op MRS (linksboven) en YPD (rechtsboven); Alcohol- (linksonder) en pH-evolutie (rechtsonder) van de fermentaties van wort (75 g/l gedroogd wortextract) door een melkzuurbacterie (*Lactobacillus brevis*) en/of gist (SafAle T-58). Negatieve controle bestond uit 100 μ l steriele saline (● = controle, ● = melkzuurbacterie, ● = melkzuurbacterie + gist, ● = gist)

4. Groei van melkzuurbacteriën in wort

Na een vorige fermentatieproef, werd waargenomen dat de melkzuurbacteriën niet groeiden in wort. Hierdoor werd nagegaan of de stock aan MZB groei en fermentatie vertoonden in wort, door de pH te volgen

Bij het opvolgen van de pH vertoonden de verschillende MZB een duidelijke daling (figuur 28). Van deze isolaten vertoonden LK-a en 1T2 een snellere pH daling na 24u dan de andere isolaten. Deze trend zette zich door voor 1T2, maar niet voor LK-a. Na 144 uur was de pH echter gedaald tot een waarde van ongeveer 3,1-3,2 voor alle isolaten behalve LK-a. Hierbij vertoonde LK-a een iets hogere pH-waarde (3,52) en 1T6-a een lagere pH-waarde (2,92).

De belangrijkste conclusie die getrokken kon worden, was dat alle MZB groei vertoonden in wort. Daarnaast kon ook besloten worden dat op de korte termijn (na 48 uur) een verschil in zuurvorming kon waargenomen worden. Hierbij vertoonden de fermentaties met *Pediococcus pentosaceus* en *Leuconostoc pseudomesenteroides* een grotere pH-daling. Op de lange termijn, na 144 uur, was echter ongeveer eenzelfde pH bereikt voor alle fermentaties. Er dient wel opgemerkt te worden dat het hier om een experiment ging zonder herhalingen. Het is dan ook aangewezen om het experiment te herhalen en een one-way anova analyse uit te voeren om te kijken of er significante verschillen zijn, in pH-vorming, tussen de isolaten. Daarnaast is het ook aangewezen om na te gaan of de pH-daling door melkzuurproductie werd veroorzaakt. Daarom zou, bij een volgende fermentatieproef, de melkzuurconcentratie bepaald moeten worden.



Figuur 28: Opvolging van de pH gedurende de fermentatie door *Lactobacillus brevis* (1D2), *Lactobacillus brevis* (1P4-a), *Pediococcus pentosaceus* (1T2), *Lactobacillus plantarum* (1T6-a), *Pediococcus pentosaceus* (2 Gerst B5C), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (FD-a), *Lactococcus lactis* (LK-a) en *Lactobacillus plantarum* (VM-a) in wort (75 g/l wortextract). De negatieve controle bestond uit 100 μ l van de 0,9% saline-oplossing die aan het medium werd toegevoegd (● = 1D2, ● = 1P4-a, ● = 1T2, ● = 1T6-a, ● = 2 Gerst B5C, ● = FB-a, ● = LK-a, ● = VM-a, ● = controle).

5. Groei van melkzuurbacteriën in wort met verschillende ethanolconcentraties

De groei van *Lactococcus lactis* (LK-a) en *Lactobacillus brevis* (1D2) in wort met verschillende ethanolconcentraties werd uitgezet in groeicurves op basis van de OD600 waarden (figuren 29 en 30). Voor beide valt vooral op te merken dat de groeicurves elkaar regelmatig snijden, naargelang de tijd van het meetpunt.

Om te weten te komen of er significante verschillen aanwezig waren voor de groei tussen de verschillende ethanolconcentraties, werd voor ieder meetpunt (0, 24, 48, 72 en 144 uur) een one-way anova analyse uitgevoerd. Hierbij werd gekeken of de gemiddelde waarden van de verschillende ethanolconcentraties significant verschilden. Om een one-way anova uit te voeren dienden eerst de normaliteit en de homoscedasticiteit nagegaan te worden. Deze voldeden voor beide fermentaties (LK-a en 1D2).

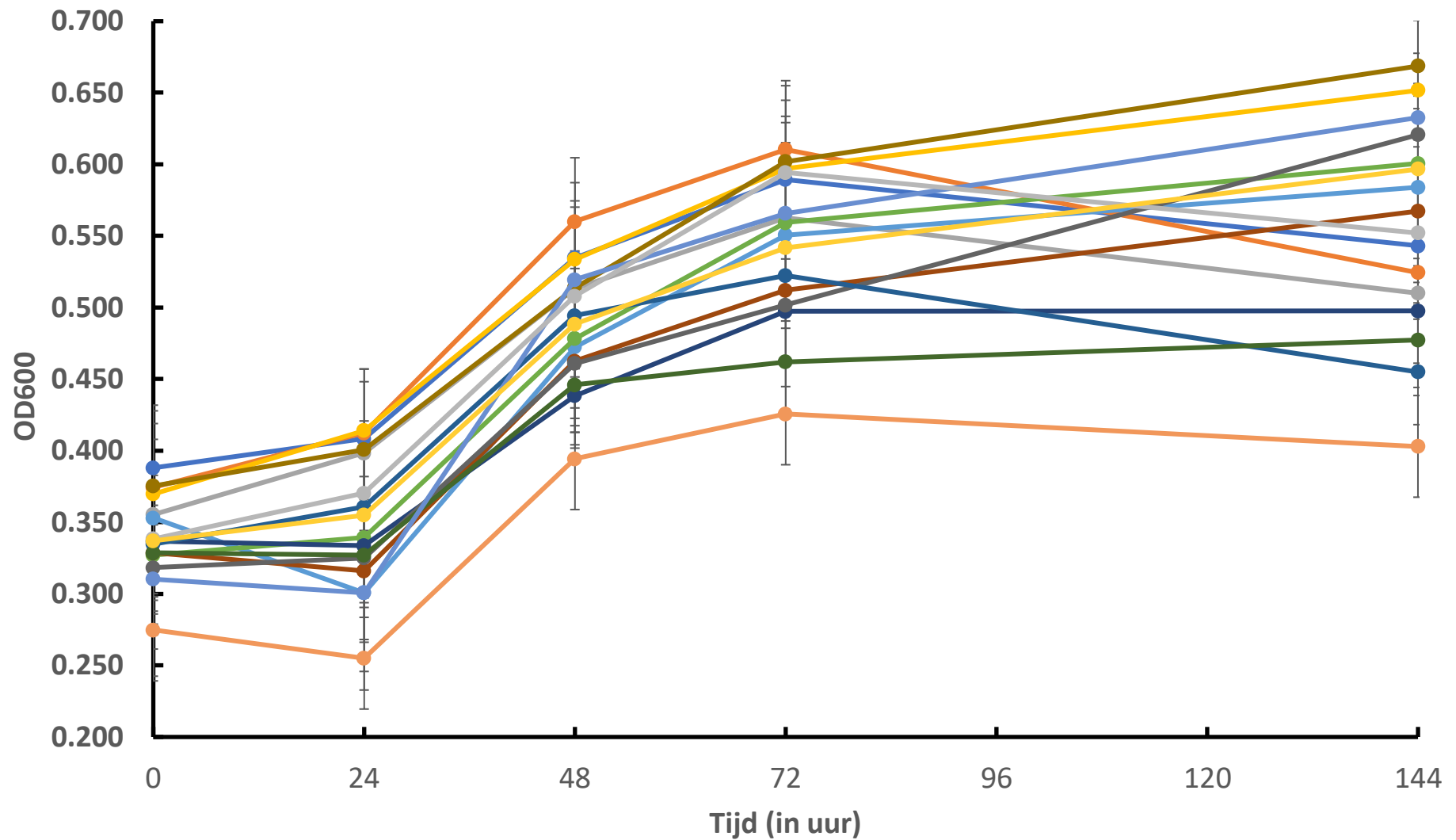
Voor LK-a (*Lactococcus lactis*) waren de p-waarden van de meetpunten respectievelijk 0,999; 0,993; 0,997; 0,963 en 0,885 waren. Met een 95% betrouwbaarheidsinterval kon dus gezegd worden dat er geen verschillen te zien waren tussen de verschillende ethanolconcentraties. Voor 1D2 (*Lactobacillus brevis*) waren de bekomen p-waarden van de meetpunten respectievelijk 0,0000141; 0,118; 0,049; 0,081 en 0,524. Hieruit bleek dus dat met een betrouwbaarheidsinterval van 95% er significante verschillen waren tussen de ethanolconcentraties bij meetpunten 0 en 72 uur.

Er werd verwacht dat er een duidelijk verschil zou waar te nemen zijn van de groei bij de verschillende ethanolconcentraties in het groeimedum. Hierbij zou de groei kunnen afnemen of zelfs niet plaatsvinden naargelang het medium een hogere ethanolconcentratie bevat (Berger et al., 1980; Ingram, 1976). Voor 1D2 werd bij het tijdstip van 0 uur een significant verschil gezien van de OD600 bij de verschillende ethanolconcentraties. Dit is tegen de verwachtingen

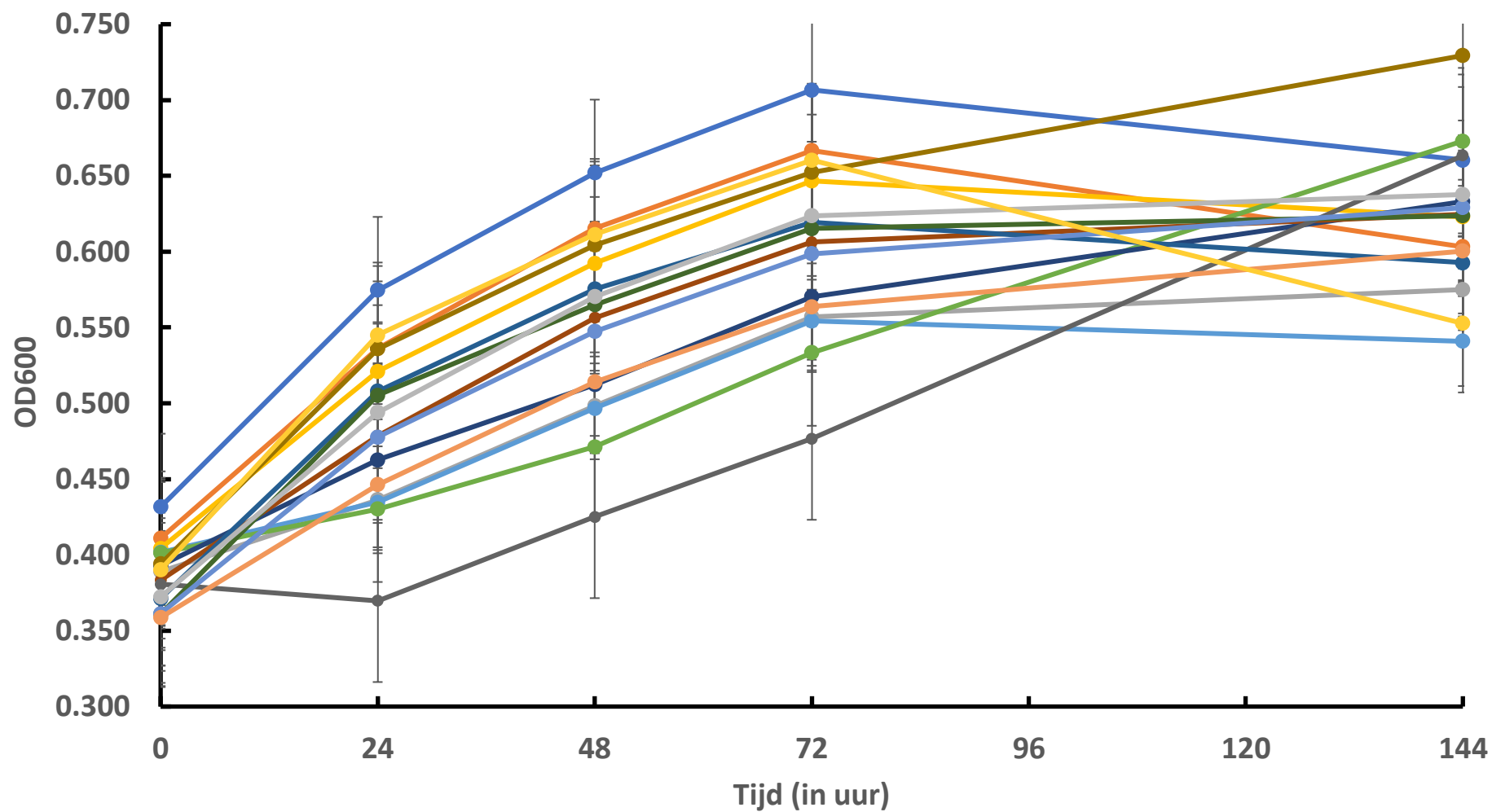
in, omdat eenzelfde concentratie aan melkzuurbacteriën werd geïnoculeerd bij alle welletjes. Na het herbekijken van het protocol werd hier al een groot probleem gezien. Doordat verschillende hoeveelheden (in volume) geïnoculeerd wort en ethanoloplossing werden toegevoegd aan de welletjes, verschilt de OD600 hierin. Het is aangewezen om de set-up van dit experiment, bij een volgende herhaling, aan te passen zodat aan ieder welletje gelijke hoeveelheden (in volume) van het geïnoculeerd wort en de verschillende ethanoloplossingen worden toegevoegd. Hierdoor zijn de bekomen resultaten niet betrouwbaar en is een heranalyse, met de aangepaste set-up van het experiment, aangewezen. Bij LK-a werd geen significant verschil gezien bij de verschillende tijdspunten, maar werd ook hetzelfde probleem waargenomen. Ook hier zijn de resultaten dus niet betrouwbaar en zou een heranalyse moeten uitgevoerd worden.

Daarnaast werd ook geen rekening gehouden met verdamping van zowel ethanol als water gedurende de fermentatie. Dit zou in de toekomst verholpen kunnen worden door gebruik te maken van een afdekfolie. Nadelig aan deze folie is dat er druppels zouden gevormd kunnen worden op de folie, wat dan weer een invloed zou kunnen hebben op de spectrofotometrische meting.

Ondanks dat de foute set-up nog niet volledig op punt stond, werd wel gezien dat deze manier van fermentaties uitvoeren in een 96-well plaat, een mogelijke manier was om een hoge *throughput* te verkrijgen. Daarom werd besloten om het experiment te herhalen.



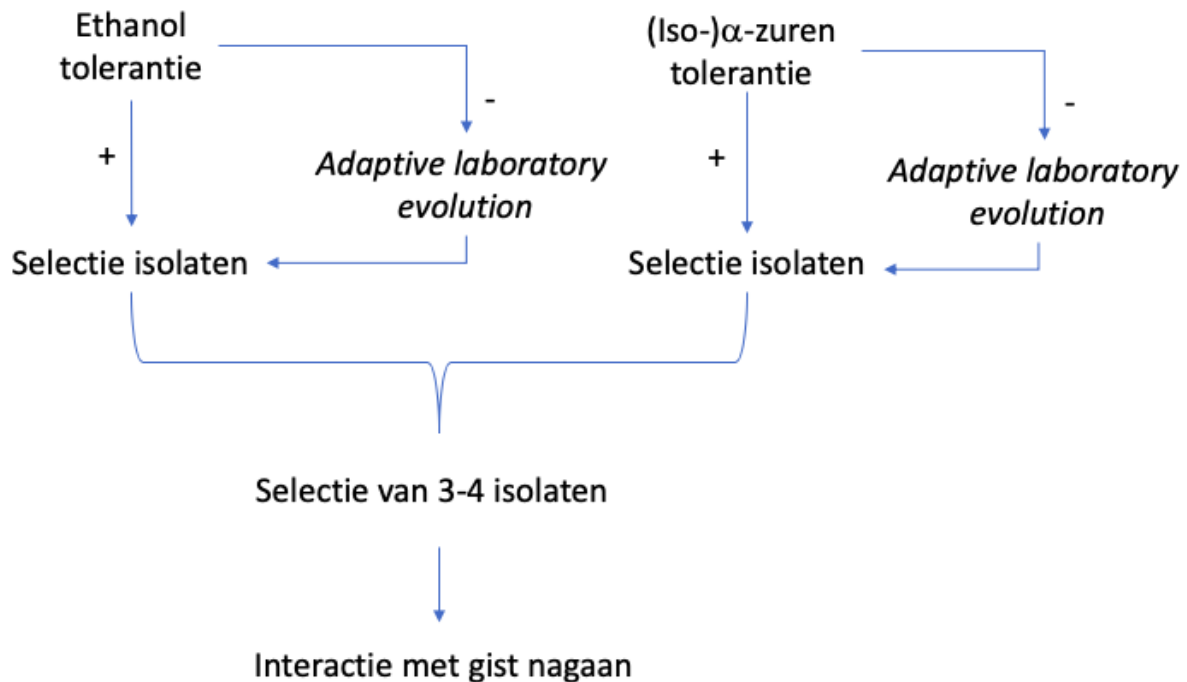
Figuur 29: Invloed van de ethanolconcentratie op de groei van LKa (*Lactococcus lactis*) in wort (75 g/l wortextract) (● = 0,00% ● = 0,50%, ● = 1,00%, ● = 1,50%, ● = 2,00%, ● = 2,50%, ● = 3,00%, ● = 3,50%, ● = 4,00%, ● = 4,50%, ● = 5,00%, ● = 5,50%, ● = 6,00%, ● = 6,50%, ● = 7,00% en ● = 7,50%).



Figuur 30: Invloed van de ethanolconcentratie op de groei van 1D2 (*Lactobacillus brevis*) in wort (75 g/l wortextract) (● = 0,00% ● = 0,50%, ● = 1,00%, ● = 1,50%, ● = 2,00%, ● = 2,50%, ● = 3,00%, ● = 3,50%, ● = 4,00%, ● = 4,50%, ● = 5,00%, ● = 5,50%, ● = 6,00%, ● = 6,50%, ● = 7,00% en ● = 7,50%).

Geplande experimenten

Er werd een stappenplan opgemaakt voor verder experimenten die zouden kunnen uitgevoerd worden (figuur 31). Hierbij is het aangewezen om de tolerantie van de isolaten te testen voor enerzijds ethanol en anderzijds α -zuren en iso- α -zuren. Op basis van deze testen kan kennis verworven worden over hoe tolerant de MZB zijn tegenover deze componenten, waarna een selectie van geschikte MZB kan gemaakt worden. Eventueel kan door middel van ALE de tolerantie tegen ethanol, α -zuren en iso- α -zuren verhoogd worden, als dit nodig zou zijn. De laatste stap is dan om na te gaan hoe de interactie met gist verloopt tijdens de fermentatie.



Figuur 31: Schematisch overzicht van de verdere strategie voor de geplande experimenten.

1. Groei van melkzuurbacteriën in wort met verschillende ethanolconcentraties

De bedoeling van dit experiment is om na te gaan hoe tolerant de bekomen isolaten zijn ten opzichte van de aanwezigheid van ethanol, aangezien in een latere fase de interactie tussen MZB en gisten zal nagegaan worden.

Er werd reeds een experiment uitgevoerd voor het nagaan van de groei van MZB in wort met verschillende ethanolconcentraties. Hierbij werd gewerkt met een 96-well plaat, waar geïnoculeerd wort en verschillende concentraties ethanol aan toegevoegd werden. De fermentatie werd een week lang opgevolgd door de OD600 te meten via spectrofotometrie. Hierbij werd aan ieder welletje een ander volume wort en ethanol toegevoegd, waardoor veel tijd verloren ging en pipetteerfouten gemaakt werden. Bovendien werd daardoor gestart met een verschillende OD600. Ook werd er geen rekening gehouden met de mogelijkheid van verdamping van ethanol gedurende de fermentatie. De methode leek wel goed te werken om snel een fermentatie op te volgen en een hoge throughput te verkrijgen, daarom werd beslist om dit experiment opnieuw uit te voeren met een aangepaste set-up van het experiment.

De analyse begint met het maken van wort (75 g/l wortextract in water) in Schott flessen en deze te autoclaveren. Daarna zal de wort geïnoculeerd worden met 100 μ l bacteriële suspensie (10^6 CFU/mL). Deze suspensie werd gemaakt door de MZB op te kweken in MRS broth. Vanuit

de wort zal een bepaald volume overgebracht worden in een welletje van de 96-well plaat. Daarnaast zal ook een hoeveelheid steriel gefilterde ethanoloplossing toegevoegd worden, hiervoor werden verschillende stockoplossingen met verschillende concentraties ethanol gemaakt (tabel 4). De respectievelijke hoeveelheden geïnoculeerd wort en ethanol zijn te vinden in tabel 5. Om de testreeks te maken wordt aangeraden om te werken met een multichannelpipet, hierdoor kan sneller gewerkt worden en is er minder verdamping tijdens de opzet van de proef.

Tabel 4: Aan te maken verdunningsreeks met verschillende ethanolconcentraties.

Finale ethanol concentratie		0,00%	1,00%	2,00%	3,00%	4,00%	5,00%	6,00%	7,00%
Ethanol (absoluut)	V (mL)	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00	3,50
Water	V (mL)	50,00	49,50	49,00	48,50	48,00	47,50	47,00	46,50
Finale ethanol concentratie		8,00%	9,00%	10,00%	11,00%	12,00%	13,00%	14,00%	15,00%
Ethanol (absoluut)	V (mL)	4,00	4,50	5,00	5,50	6,00	6,50	7,00	7,50
Water	V (mL)	46,00	45,50	45,00	44,50	44,00	43,50	43,00	42,50

Tabel 5: Aan te maken reeks in de 96-well plaat voor de fermentatieproef.

Finale ethanol concentratie		0,00%	0,50%	1,00%	1,50%	2,00%	2,50%	3,00%	3,50%
Wort	Volume (µL)	125	125	125	125	125	125	125	125
Ethanol	Volume (µL)	125	125	125	125	125	125	125	125
Stock oplossing ethanol	Concentratie	0,00%	1,00%	2,00%	3,00%	4,00%	5,00%	6,00%	7,00%
Finale ethanol concentratie		4,00%	4,50%	5,00%	5,50%	6,00%	6,50%	7,00%	7,50%
Wort	Volume (µL)	125	125	125	125	125	125	125	125
Ethanol	Volume (µL)	125	125	125	125	125	125	125	125
Stock oplossing ethanol	Concentratie	8,00%	9,00%	10,00%	11,00%	12,00%	13,00%	14,00%	15,00%

De plaat zal in de spectrofotometer geplaatst worden en geschud worden, waarna de OD600 zal afgelezen worden gedurende 7 dagen (iedere dag 1 maal). Tussen iedere meting zal de plaat in een warme kamer op 25°C geïncubeerd worden. Om verdamping van de ethanol in het medium tegen te gaan kan een doorzichtige folie over de plaat aangebracht worden. Hierdoor zouden mogelijks wel druppels op de folie gaan plakken wat een verkeerde meting zou kunnen geven in de spectrofotometer.

Na 7 dagen zal ook de melkzuurconcentratie bepaald worden. Hiervoor zal de plaat worden gecentrifugeerd en zal 20 µl van het supernatans overgebracht worden in een andere 96-well

plaat die 180 µl water per welletje bevatte. De plaat zal geschud worden en 30 µl van deze bekomen oplossingen zal uit de welletjes gehaald worden en in een nieuwe plaat overgebracht worden, waarin 220 µl van een 0,3% FeCl₃-oplossing (5g/l van FeCl₃.6H₂O, RPL) aanwezig is. De plaat zal hierna opnieuw geschud worden, waarna de absorbantie kan gemeten worden bij 390nm (Rosenberg & Rush, 1966). Na het toevoegen van de FeCl₃-oplossing, is het aangeraden om snel te meten aangezien de ontstane kleur wordt afgebroken gedurende de tijd.

Om de melkzuurconcentratie van de stalen te bepalen zal ook een ijklijn van melkzuur aangemaakt worden (tabel 6) uit een 15 g/l stockoplossing. Er zal 30 µl van een 10x verdunning van de ijklijn in de welletjes gepipetteerd worden, waarna 220 µl van de 0,3% FeCl₃-oplossing zal toegevoegd worden. Na schudden zal de absorbantie gemeten worden bij 415nm.

Tabel 6: Opmaak van de melkzuur-ijklijn vanuit een 15g/l stockoplossing voor de bepaling van melkzuurconcentratie via spectrofotometrie.

Eind-Concentratie melkzuur	15 g/l	10 g/l	7,5 g/l	5 g/l	2,5 g/l	1 g/l	0 mg/l
Water (mL)	0	5	7,5	10	12,5	14	15
Stockoplossing 15 g/l (mL)	15	10	7,5	5	2,5	1	0

Verwacht wordt dat de MZB een verschillende tolerantie tegen ethanol zullen vertonen. Een mogelijkheid is dat er geen stammen zijn die een geschikte tolerantie vertonen tegen ethanol, wat problemen kan geven tijdens de latere fermentatie van het bier. Dit zou opgelost kunnen worden door de tolerantie te verhogen via *ALE*, indien nodig. Daarnaast kan ook bekeken worden om de fermentatie door MZB eerst te laten uitvoeren en later de gist toe te voegen.

2. Extractie van α-zuren en iso-α-zuren uit hoppellets

Om de gevoeligheid van MZB ten opzichte van α-zuren en iso-α-zuren te onderzoeken zal een wortfermentatie gestart worden met verschillende concentraties van deze componenten. Er is algemeen geweten, dat iso-α-zuren een bactericide werking hebben tegenover Gram positieve bacteriën (Bokulich & Bamforth, 2013). In de literatuur kon echter geen informatie gevonden worden over het effect van α-zuren. Daarom zou de wortfermentatie kunnen uitgevoerd worden met concentraties iso-α-zuren en α-zuren, om het effect van beide met elkaar te kunnen vergelijken.

Er werd gekeken om α-zuren extract te kunnen aankopen, maar hierbij kwamen een aantal problemen naar voor. Zo zijn er veel ethanolextracten te vinden, maar deze zouden een verkeerd effect kunnen geven aangezien ethanol ook de MZB zou kunnen afdoden, daarnaast zijn deze extracten duur en hebben deze een beperkte houdbaarheid. Daarom werd gekeken om de α-zuren zelf te kunnen extraheren via een waterige extractie, gebruik makend van een ultrasoonbad voor efficiëntere extractie (Gil-Ramírez et al., 2012; Hoggan, 1968; Vinatoru, 2001). Na de extractie zou dan een deel van het extract kunnen gekookt worden om de α-zuren te isomeriseren tot iso-α-zuren. Hierdoor zal de samenstelling van het α-zuren en iso-α-zuren extract zeer gelijkaardig zijn en een goede vergelijking toelaten.

Om de extractie uit te voeren zullen hop pellets worden toegevoegd aan water (25 g/l) in een erlenmeyer. Aan dit mengsel zal een roervlo toegevoegd worden en het mengsel zal op een verwarm- en roerplaat gemengd worden gedurende 2 uur op 60°C. Na menging zal de

erlenmeyer in een ultrasoonbad geplaatst worden gedurende 30 minuten. Ten slotte zal het mengsel gefiltreerd worden via filtratie.

Na extractie zal een deel van het extract gekookt worden gedurende een uur, waardoor de aanwezige α -zuren geïsomeriseerd zullen worden. Voor deze geïsomeriseerde en niet-geïsomeriseerde mengsels zal nadien de fractie aan iso- α -zuren bepaald worden aan de hand van een spectrofotometrische methode (European Brewery Convention, 2006, Analytica-EBC, 7.8) (Mudura, Tofană, Muste, Păucean, & Socaci, 2009). Hierbij worden deze uit het geïsomeriseerde mengsel geëxtraheerd door toevoeging van iso-octaan, waarna hun concentratie gemeten wordt via spectrofotometrie bij een golflengte van 275 nm. Om het gehalte α -zuren te bepalen kan gebruik gemaakt worden van de ASBC Hops-8 (I) methode of van HPLC (Andrew P. Zdzieblo., 2015; Hopsteiner, 2020).

Verwacht wordt dat twee extracten worden verkregen (α -zuren- en iso- α -zuren-extract), waarbij het gehalte aan α -zuren en iso- α -zuren bepaald is. Hoe hoger het percentage van deze componenten in hun extract, hoe beter. Stel dat toch er toch te weinig van deze componenten geëxtraheerd kunnen worden, kan voor het verdere verloop van de proeven toch gebruik gemaakt worden van aangekochte extracten.

3. Groei van melkzuurbacteriën in wort met verschillende concentraties α -zuren en iso- α -zuren

MZB ondervinden een inhiberend effect op hun groei door iso- α -zuren. Toch zijn er verschillende stammen die tolerant zijn ten opzichte van de iso- α -zuren. Het doel van deze assay is om na te gaan hoe tolerant de verschillende isolaten zijn tegen iso- α -zuren. Daarnaast is er weinig te vinden in de literatuur omtrent de tolerantie van melkzuurbacteriën tegenover α -zuren. Daarom wordt het experiment ook uitgevoerd met α -zuren om na te gaan of ook de α -zuren een invloed hebben op de groei en vanaf welke concentratie.

Om de invloed van de verschillende iso- α -zuren concentraties op de groei van MZB in wort na te gaan, zal gebruik gemaakt worden van een gelijkaardige set-up die eerder gebruikt werd voor de tolerantie tegen ethanol na te gaan. De α -zuren en iso- α -zuren komen bij voorkeur uit de extractie die zelf uitgevoerd werd, maar kunnen ook afkomstig zijn uit aangekochte extracten.

Voor dit experiment zal wort (75 g/l wortextract in water) aangemaakt worden in Schott flessen, die vervolgens geautoclaveerd zullen worden. Daarna zal het wort geïnoculeerd worden met 100 μ l bacteriële suspensie (10^6 CFU/mL), die gemaakt werd door MZB op te groeien in MRS-broth. Vanuit dit medium zal een bepaald volume overgebracht worden in een welletje van de 96-well plaat. Daarnaast wordt aan ieder welletje ook een bepaalde concentratie aan steriel gefilterde iso- α -zuren toegevoegd. Aangezien hiervan nog niet het exacte bitterheidsgehalte gekend is, kan een gedetailleerde set-up nog niet beschreven worden. Er zal gewerkt worden met een range van 0,00 IBU tot 48,00 IBU.

De OD600 zal gedurende 7 dagen (iedere dag 1 maal) bepaald worden. Tussen iedere meting zal de plaat in een warme kamer op 25°C geïncubeerd worden. Om verdamping van het medium tegen te gaan kan een doorzichtige folie over de plaat aangebracht worden. Hierdoor zouden mogelijks wel druppels op de folie gaan plakken wat een verkeerde meting zou kunnen geven in de spectrofotometer.

Na 7 dagen zal ook de melkzuurconcentratie bepaald worden, zoals eerder beschreven.

Hetzelfde experiment zal ook uitgevoerd worden op dezelfde wijze, maar waarbij de iso- α -zuren worden vervangen door α -zuren (het niet-geïsomeriseerde extract).

Verwacht wordt dat de MZB een verschillende tolerantie tegen iso- α -zuren zullen vertonen. Op basis van deze resultaten kan dan een selectie gemaakt worden van geschikte MZB om mee verder te werken. Een andere mogelijkheid is dat er geen stammen zullen zijn die een geschikte tolerantie vertonen tegen iso- α -zuren, wat problemen kan geven tijdens de latere fermentatie van het bier. Dit zou opgelost kunnen worden door de tolerantie te verhogen via *ALE*, indien nodig. Daarnaast kan ook bekeken worden om de fermentatie door MZB eerst te laten uitvoeren en eenmaal deze is afgelopen iso- α -zuren extract te gaan toevoegen. Verder zal ook een conclusie kunnen getrokken worden omtrent het inhiberende effect van α -zuren op de groei van melkzuurbacteriën.

4. Adaptatie van melkzuurbacteriën tegen ethanol, α -zuren en iso- α -zuren

Er is de mogelijkheid dat de MZB geen geschikte tolerantie zullen vertonen tegenover ethanol, α -zuren en iso- α -zuren. Deze conclusies kunnen enkel getrokken worden na de vorige experimenten. Om rekening te houden met deze conclusies, is het dus noodzakelijk om te gaan kijken naar alternatieven. Het gebruik van geïsomeriseerde extracten, die na de fermentatie toegevoegd worden, werd al eerder vermeld om het probleem omtrent iso- α -zuren op te lossen. Maar er is ook echter ook de mogelijkheid om de MZB te laten adapteren tegen de componenten via *adaptive laboratory evolution (ALE)* (Dragosits & Mattanovich, 2013; Horinouchi et al., 2018).

Hiervoor zal geautoclaveerd MRS-medium (51 g/l MRS-broth, Sigma-aldrich) aangemaakt en verdeeld worden in proefbuizen (10mL per stuk). Nadien zal een proefbuis geïnoculeerd worden met het isolaat, waarna incubatie volgt (24u, bij 30°C). Na inoculatie zullen de proefbuizen gevortext worden, waarna een aliquot van de proefbuis kan worden overgebracht in een nieuwe proefbuis met MRS medium die een bepaalde concentratie aan steriel gefilterde ethanol of iso- α -zuren bevat (bv 0,5%). Opnieuw zal geïncubeerd worden en nadien een aliquot overgebracht worden in MRS-medium met een hogere concentratie. Deze stappen kunnen enkele keren herhaald worden om verhoogde tolerantie te krijgen tegenover de componenten. Momenteel werd bij het uitdenken van dit experiment geen rekening gehouden met inhiberende effecten door α -zuren, maar adaptatie aan deze component zou kunnen uitgevoerd worden via *ALE*.

Verwacht wordt dat de melkzuurbacteriën zich kunnen aanpassen aan de omstandigheden en toleranter worden aan de componenten die zich in het medium bevinden. Er dienen voldoende voedingsstoffen aanwezig te zijn en gewerkt te worden bij een geschikte temperatuur en pH, zodat de MZB enkel stress ondervinden van ethanol, α -zuren of iso- α -zuren.

5. Interactie tussen melkzuurbacteriën en gist bij wortfermentatie

Na het bekomen van een aantal isolaten die een geschikte tolerantie vertonen voor ethanol, iso- α -zuren en eventueel α -zuren, kan nagegaan worden hoe deze geïmplementeerd kunnen worden tijdens de fermentatie. Vaak wordt gezien dat bij een contaminatie met melkzuurbacteriën, de gisten overgroeid kunnen worden. Dit gebeurt door (i) productie van eindproducten zoals melkzuur, die de groei van gisten inhiberen of (ii) het verliezen van de competitie voor de aanwezige nutriënten, nodig voor de groei (Bayrock & Ingledew, 2004). Ook het omgekeerde kan hierbij gelden, waarbij een gist bijvoorbeeld ethanol zal gaan vormen

en de groei van melkzuurbacteriën op deze manier inhibeert. Dit laatste zou eventueel opgelost kunnen worden door een MZB te gebruiken met een hoge ethanol tolerantie. Om deze redenen, moet worden nagegaan hoe de fermentatie het beste kan verlopen. Dient eerst de fermentatie van melkzuurbacteriën door te gaan, alvorens deze door gisten of omgekeerd? Of kunnen beide fermentaties tegelijk doorgaan?

Er zal wort gemaakt worden (75 g wortextract oplossen in 1L water), waarvan telkens 200 mL zal worden verdeeld in Schott flessen van 250 mL en die geautoclaveerd zullen worden. Hierna zullen een aantal fermentaties opgevolgd worden (bij 25°C). (i) Vier flessen worden geïnoculeerd met melkzuurbacteriën op dag 0, waarna op dag 1, 2 en 3 telkens aan één fles gist (SafAle T-58) wordt toegevoegd, 1 fles blijft enkel geïnoculeerd met melkzuurbacteriën. (ii) Een fles wordt tegelijk geïnoculeerd met melkzuurbacteriën en gist. (iii) Vier flessen worden geïnoculeerd met gist op dag 0, waarna op dag 1, 2 en 3 telkens aan één fles melkzuurbacteriën worden toegevoegd, 1 fles blijft enkel geïnoculeerd met melkzuurbacteriën. In een volgend stadium kan ook de invloed van de concentratie van de inocula op het fermentatieproces en het finale bier worden nagegaan.

Het proces zal worden opgevolgd door van iedere fles (iedere dag) selectieve uitplatingen te doen op MRS- en YPD-agar. Hiervoor zal een verdunningsreeks van de stalen worden aangelegd met steriele saline. Van deze verdunningsreeks zal 100 µL van de suspensie uitgeplaat worden om, na incubatie van 3-5 dagen op 30°C, het aantal kolonievormende eenheden te tellen. Iedere uitplating dient in triplicaat uitgevoerd te worden.

Na 10 dagen zal ook de pH, het ethanolgehalte en de densiteit bepaald worden. Daarnaast zal ook het melkzuurgehalte bepaald worden, zoals eerder beschreven.

Er wordt verwacht om een verschil in groei en flavour te verkrijgen gedurende de verschillende fermentaties. Op basis hiervan kan een keuze gemaakt worden welke fermentatie het meest geschikt is: eerst MZB, dan gist; eerst gist, dan MZB of tegelijkertijd.

Er dient opgemerkt te worden dat momenteel enkel rekening gehouden is met de factor tijd en de concentratie van het inoculum. Zo is momenteel enkel gewerkt met een *ale* gist, aangezien deze fermenteert bij een optimale temperatuur van 16-24°C, wat dichterbij de optimale temperatuur van melkzuurbacteriën (25-40°C) ligt dan *lager* gist (optimale temperatuur 7-13°C). Er zou ook kunnen onderzocht worden wat het effect is op het finale bier bij gebruik van een *lager* gist.

6. Stoppen van het fermentatieproces

Een laatste stap van het onderzoek, is nagaan hoe de melkzuurfermentatie gestopt kan worden, om te vermijden dat een heel zuur bier verkregen wordt. Dit zou kunnen vanzelf gebeuren doordat nutriëntendepletie optreedt of doordat de MZB geïnhibeerd worden door te hoge concentraties aan ethanol. Een andere manier waarop de melkzuurfermentatie zou gestopt kunnen worden is via pasteurisatie.

Er zal geautoclaveerd wort aangemaakt en verdeeld worden in Schott flessen die geïnoculeerd zullen worden met de (eerder besloten) concentraties aan melkzuurbacteriën en gist op de bepaalde tijdstippen (ook uit eerdere experimenten verkregen). Bij het bekomen van het gewenste bier, zal een fles gepasteuriseerd worden door deze op 65°C te plaatsen gedurende 30 minuten. Na pasteurisatie zal deze verder bewaard worden op kamertemperatuur gedurende 3-5 dagen. Een andere fles zal, na fermentatie, verder bij kamertemperatuur bewaard worden voor

dezelfde periode (zonder pasteurisatie). Na 3-5 dagen zal de pH, het ethanolgehalte, de densiteit en de melkzuurconcentratie bepaald worden en een sensorische analyse uitgevoerd worden.

In het ideale geval zou blijken dat er geen pasteurisatie nodig is om de melkzuurfermentatie te beëindigen, maar stopt deze (op het juiste moment) door de aanmaak van inhiberende componenten.

Algemeen besluit

Tijdens deze masterproef werd nagegaan hoe melkzuurbacteriën, gecontroleerd, konden worden geïmplementeerd in het brouw- en fermentatieproces. De bedoeling hiervan was om een nieuw, innovatief (laag-alcoholisch) bier te verkrijgen met een lichtzure toets.

Door het wegvallen van een groot deel van het praktische werk, kon weinig ingegaan worden op het implementeren van de melkzuurfermentatie tijdens het productieproces van bier. Wel werd een stock aan geïdentificeerde melkzuurbacteriën bekomen, waarna een experiment werd opgezet om deze te testen op hun ethanol tolerantie. Dit experiment werd al een eerste maal uitgevoerd, maar de set-up diende aangepast te worden. Na aanpassing, kon het experiment niet meer herhaald worden.

Het wegvallen van een groot deel van het praktische werk, werd gecompenseerd door de literatuurstudie uit te breiden en de geplande experimenten uit te schrijven. Er werd voor dit laatste, dieper ingegaan op de ethanol-, α -zuren- en iso- α -zuren-tolerantie. Verder werden experimenten uitgewerkt om de invloed van parallelle of sequentiële fermentatie van MZB en gist na te gaan. Daarnaast werd ten slotte de invloed van de concentratie van het inoculum op het finale bier nagegaan. Met deze geplande experimenten zou dus verder kunnen gewerkt worden.

Na het einde van het onderzoek wordt in het ideale geval een hetero- of homofermentatieve melkzuurbacterie bekomen, die hoptolerant is en toe te voegen is samen met gist. Tijdens de fermentatie produceert deze melkzuurbacterie een lichtzure toets in bier (met een goede algemene flavour) en wordt deze uiteindelijk geïnhibeerd door ethanol (geproduceerd door gist), waardoor pasteurisatie niet nodig is.

Referenties

- Abboud, L. (2019). Brewers acquire a taste for non-alcoholic beer. Geraadpleegd op 21/11/2019, van <https://www.ft.com/content/639d6864-5ac9-11e9-9dde-7aedca0a081a>
- Aerts. Van gerst tot bier [PowerPoint slides]. Geraadpleegd op 24/11/2019,
- Alting, A. C., Engels, W., van Schalkwijk, S., & Exterkate, F. A. (1995). Purification and Characterization of Cystathionine (beta)-Lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and Its Possible Role in Flavor Development in Cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 61(11), 4037-4042.
- Andrew P. Zdzieblo., W. M. R. (2015). The qualitative and quantitative analysis of alfa-acids in hops and beers by UHPLC with UV detection. https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_The-Qualitative-and-Quantitative-Analysis-of-a-Acids-in-Hops-and-Beers-by-UHPLC-with-UV-Detection-012326_01.pdf
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food science and technology - New York DEKKER-*, 139, 1-66.
- Baird, J., Longyear, V., & Ellwood, D. (1973). Water insoluble and soluble glucans produced by extracellular glycosyltransferases from *Streptococcus mutans*. *Microbios*, 8(30), 143-150.
- Bayrock, D. P., & Ingledew, W. M. (2004). Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 362-368.
- Berger, B., Carty, C., & Ingram, L. (1980). Alcohol-induced changes in the phospholipid molecular species of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 142(3), 1040-1044.
- Bickham, S. (1997). An Introduction to Sensory Analysis. *Brewing Techniques*, 38, 149.
- Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157-172.
- Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P., & Blondin, B. (1997). Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *Journal of bacteriology*, 179(15), 4929-4936.
- Boon, F. (2019). Lambiek, de wildste van alle bierdromen. [PowerPoint slides].
- Boulton, C., & Quain, D. (2008). *Brewing yeast and fermentation*: John Wiley & Sons.
- Brissette, J. L., Russel, M., Weiner, L., & Model, P. (1990). Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(3), 862-866.
- Brányik, T., Vicente, A. A., Dostálek, P., & Teixeira, J. A. (2008). A review of flavour formation in continuous beer fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(1), 3-13.
- Burgé, G., Saulou-Bérion, C., Moussa, M., Allais, F., Athes, V., & Spinnler, H.-E. (2015). Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phosphoketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains. *Journal of Microbiology*, 53(10), 702-710.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.-L., . . . Nassif, X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical biochemistry*, 44(1), 104-109.
- Chaloupka, F. J., Grossman, M., & Saffer, H. (2002). The effects of price on alcohol consumption and alcohol-related problems. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 26(1), 22-34.

- Chaturvedi, V., Bartiss, A., & Wong, B. (1997). Expression of bacterial mtlD in *Saccharomyces cerevisiae* results in mannitol synthesis and protects a glycerol-defective mutant from high-salt and oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 179(1), 157-162.
- Chaturvedi, V., Wong, B., & Newman, S. L. (1996). Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates. *The Journal of Immunology*, 156(10), 3836-3840.
- Chen, E. C.-H. (1978). The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 36(1), 39-43.
- Cogan, T. M., & Jordan, K. N. (1994). Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2704-2717.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 269-280.
- De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 153-177.
- Debord, B., Lefebvre, C., Guyot-Hermann, A., Hubert, J., Bouché, R., & Cuyot, J. (1987). Study of different crystalline forms of mannitol: comparative behaviour under compression. *Drug development and industrial pharmacy*, 13(9-11), 1533-1546.
- Deguchi, Y., & Morishita, T. (1992). Nutritional requirements in multiple auxotrophic lactic acid bacteria: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways in *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Pediococcus acidilactici*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(6), 913-918.
- Dias, B., & Weimer, B. (1998). Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacilli, and brevibacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 64(9), 3320-3326.
- Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution—principles and applications for biotechnology. *Microbial cell factories*, 12(1), 64.
- Druglijn. (z.d.). *Alcohol: de cijfers*. Geraadpleegd op 24/02/2020, van <https://www.druglijn.be/over-ons/schoolopdracht-drugs/cijfers-en-statistieken/alcohol>
- Dumolin, C., Aerts, M., Verheyde, B., Schellaert, S., Vandamme, T., Van der Jeugt, F., . . . Cleenwerck, I. (2019). Introducing SPeDE: High-Throughput Dereplication and Accurate Determination of Microbial Diversity from Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Data. *MSystems*, 4(5), e00437-00419.
- Eden, A., Van Nederveelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N., & Debourg, A. (2001). Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(3), 296-300.
- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreira, C. (2013). Yeast: world's finest chef. In *Food Industry*: IntechOpen.
- Fath, M. J., & Kolter, R. (1993). ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57(4), 995-1017.
- Ferain, T., Schanck, A., & Delcour, J. (1996). ¹³C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an IdhL-IdhD double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of bacteriology*, 178(24), 7311-7315.

- Ford, G., & Ellis, E. M. (2002). Characterization of Ypr1p from *Saccharomyces cerevisiae* as a 2-methylbutyraldehyde reductase. *Yeast*, 19(12), 1087-1096.
- Fraunhofer, M. (2018). Characterization of EPS-producing brewery-associated lactobacilli. Technische Universität München.
- Fraunhofer, M. E., Geissler, A. J., Wefers, D., Bunzel, M., Jakob, F., & Vogel, R. F. (2018). Characterization of β -glucan formation by *Lactobacillus brevis* TMW 1.2112 isolated from slimy spoiled beer. *International journal of biological macromolecules*, 107, 874-881.
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J. L., Maere, S., Verstrepen, K. J., & Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current opinion in biotechnology*, 49, 148-155.
- Ganzhorn, A., Green, D., Hershey, A., Gould, R., & Plapp, B. (1987). Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. Amino acid residue 294 and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 262(8), 3754-3761.
- Giffard, P. M., Allen, D. M., Milward, C. P., Simpson, C. L., & Jacques, N. A. (1993). Sequence of the gtfK gene of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the gtf genes of oral streptococci. *Microbiology*, 139(7), 1511-1522.
- Gil-Ramírez, A., Mendiola, J. A., Arranz, E., Ruíz-Rodríguez, A., Reglero, G., Ibáñez, E., & Marín, F. R. (2012). Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. *Innovative food science & emerging technologies*, 16, 54-60.
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 251-260.
- Grobbe, G. J., Peters, S. W., Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Hoefnagel, M. H., Hugenholtz, J., & Eggink, G. (2001). Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose. *Applied Environmental Microbiology*, 67(6), 2867-2870.
- Groot, M. N. N., & de Bont, J. A. (1998). Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied Environmental Microbiology*, 64(8), 3009-3013.
- Gupta, C., Prakash, D., & Gupta, S. (2015). A biotechnological approach to microbial based perfumes and flavours. *Journal of Microbiology and Experiments*, 3(1).
- Gänzle, M., & Follador, R. (2012). Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Frontiers in microbiology*, 3, 340.
- Hayashi, N., Ito, M., Horiike, S., & Taguchi, H. (2001). Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(5), 596-603.
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., Van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied Environmental Microbiology*, 74(8), 2259-2266.
- Hoggan, J. (1968). Ultrasonic hop extraction. *Ultrasonics*, 6(4), 217-219.
- Hopsteiner. (2020). CO₂ extract. Geraadpleegd op 18/05/2020, van https://www.hopsteiner.com/wp-content/uploads/2018/10/05_10_CO2_Extract.pdf

- Horinouchi, T., Maeda, T., & Furusawa, C. (2018). Understanding and engineering alcohol-tolerant bacteria using OMICS technology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(11), 157.
- Hornsey, I. S. (2003). *A history of beer and brewing* (Vol. 34): Royal Society of Chemistry.
- Hutkins, R. W. (2008). *Microbiology and technology of fermented foods* (Vol. 22): John Wiley & Sons.
- Ingram, L. (1976). Adaptation of membrane lipids to alcohols. *Journal of bacteriology*, 125(2), 670-678.
- Jennings, D. (1985). Polyol metabolism in fungi. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 25, pp. 149-193): Elsevier.
- Jindrich, P. (2019). *MALDI-TOF MS @ BCCM/LMG and LM-UGent: a general introduction* [PowerPoint slides].
- Joosten, H. (1988). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese.
- Jurinke, C., Oeth, P., & van den Boom, D. (2004). MALDI-TOF mass spectrometry. *Molecular biotechnology*, 26(2), 147-163.
- Karovičová, J., & Kohajdová, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chemical papers*, 59(1), 70-79.
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(3), 233-244.
- Kets, E. P. (1997). Compatible solutes in lactic acid bacteria subjected to water stress: Kets.
- Konings, W., Poolman, B., Driessen, A., & Maloney, P. C. (1989). Bioenergetics and solute transport in lactococci. *CRC Critical reviews in microbiology*, 16(6), 419-476.
- Kruger, L., Pickerell, A., & Axcell, B. (1992). The sensitivity of different brewing yeast strains to carbon dioxide inhibition: fermentation and production of flavour-active volatile compounds. *Journal of the Institute of Brewing*, 98(2), 133-138.
- Kunze, W. (1999). Beer production. *Technology brewing and malting" International Ed VLB Berlin*, 323-335.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In *The yeasts* (pp. 87-110): Elsevier.
- Lafontaine, S. R., & Shellhammer, T. H. (2018). Impact of static dry-hopping rate on the sensory and analytical profiles of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 434-442.
- Lee, S. Y., Nielsen, J., & Stephanopoulos, G. (2016). *Industrial biotechnology: microorganisms*: John Wiley & Sons.
- Lees, G., & Jago, G. (1976). Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, 43(1), 75-83.
- Lepage, C., Fayolle, F., Hermann, M., & Vandecasteele, J. (1987). Changes in membrane lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during acetone-butanol fermentation: effects of solvents, growth temperature and pH. *Microbiology*, 133(1), 103-110.
- Leslie, S. B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J. H., & Crowe, L. M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology*, 61(10), 3592-3597.
- Leuschner, R. G., Kurihara, R., & Hammes, W. P. (1998). Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International journal of food microbiology*, 44(1-2), 15-20.

- Longo, M. A., & Sanromán, M. A. (2006). Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. *Food Technology and Biotechnology*, 44(3), 335-353.
- Lowe, D. P., & Arendt, E. K. (2004). The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(3), 163-180.
- Malteurop. From barley to malt. van <https://www.malteurop.com/en/de-lorge-au-malt>
- Mazzoli, R., Bosco, F., Mizrahi, I., Bayer, E. A., & Pessione, E. (2014). Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnology Advances*, 32(7), 1216-1236.
- Meussdoerffer, F. G. (2009). A comprehensive history of beer brewing. *Handbook of brewing: Processes, technology, markets*, 1-42.
- Milward, C. P., & Jacques, N. A. (1990). Secretion of fructosyltransferase by *Streptococcus salivarius* involves the sucrose-dependent release of the cell-bound form. *Microbiology*, 136(1), 165-169.
- Monchois, V., Willemot, R.-M., & Monsan, P. (1999). Glucansucrases: mechanism of action and structure–function relationships. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 131-151.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., & Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675-685.
- Montanari, L., Perretti, G., Natella, F., Guidi, A., & Fantozzi, P. (1999). Organic and phenolic acids in beer. *LWT-Food Science and Technology*, 32(8), 535-539.
- Mooser, G. (1992). 5 Glycosidases and Glycosyltransferases. In *The enzymes* (Vol. 20, pp. 187-233): Elsevier.
- Mosher, M., & Trantham, K. (2017). *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*: Springer.
- Mudura, E., Muste, S., Tofana, M., Socaci, S., & Goina, V. (2008). Improving the hop utilization in the beer biotechnology. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Agriculture*, 65(2).
- Mudura, E., Tofană, M., Muste, S., Păucean, A., & Socaci, S. (2009). The evaluation of hop utilisation in brewing process. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 15(2), 249-252.
- Neidhardt, F., VanBogelen, R., & Vaughn, V. (1984). The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 18(1), 295-329.
- Nelson, M. (2003). The cultural construction of beer among Greeks and Romans. *Syllecta Classica*, 14(1), 101-120.
- Neves, A. R., Ramos, A., Shearman, C., Gasson, M. J., Almeida, J. S., & Santos, H. (2000). Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using in vivo ¹³C-NMR. *European journal of biochemistry*, 267(12), 3859-3868.
- Nuraida, L., Grigolava, I., Owens, J., & Campbell-Platt, G. (1992). Oxygen and pyruvate as external electron acceptors for *Leuconostoc* spp. *Journal of applied bacteriology*, 72(6), 517-522.
- Oku, H., & Kaneda, T. (1988). Biosynthesis of branched-chain fatty acids in *Bacillus subtilis*. A decarboxylase is essential for branched-chain fatty acid synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18386-18396.
- Oliveira, P., Brosnan, B., Jacob, F., Furey, A., Coffey, A., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2015). Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. *Food Control*, 51, 444-452.

- Olsovska, J., Bostikova, V., Dusek, M., Jandovska, V., Bogdanova, K., Cermak, P., . . . Kolar, M. (2016). *Humulus lupulus* L.(hops)—a valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies. *Mil Med Sci Lett (Voj Zdrav Listy)*, 85(1), 19-30.
- Palm. (2019). *Schematisch overzicht van het brouwproces*.
 . Geraadpleegd op 24/10/2019, van <https://www.palm.be/nl/palm/process>
- Papagianni, M. (2012). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and structural biotechnology journal*, 3(4), e201210003.
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(5), 1937-1949.
- Poolman, B., Driessen, A., & Konings, W. N. (1987). Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values. *Microbiological reviews*, 51(4), 498.
- Puncha-arnon, S., Pathipanawat, W., Puttanlek, C., Rungsardthong, V., & Uttapap, D. (2008). Effects of relative granule size and gelatinization temperature on paste and gel properties of starch blends. *Food research international*, 41(5), 552-561.
- Richards, M., & Macrae, R. (1964). The significance of the use of hops in regard to the biological stability of beer. II. The development of resistance to hop resins by strains of lactobacilli. *Journal of the Institute of Brewing*, 70(6), 484-488.
- Rickus, S., Mackey. (2016). *AQA GCSE Food preparation & nutrition*.
- Robinow, C., & Johnson, B. F. (1991). Yeast cytology: an overview. *The yeasts*, 4, 7-120.
- Roncoroni, M., Verstrepén, K., Vangansbeke, J., Permsuvan, M., & Thyssen, E. (2018). *Belgisch bier: getest en geproefd : de complete gids*.
- Rosenberg, J., & Rush, B. (1966). An enzymatic-spectrophotometric determination of pyruvic and lactic acid in blood: methodologic aspects. *Clinical chemistry*, 12(5), 299-307.
- Rouse, S., & van Sinderen, D. (2008). Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *Journal of food protection*, 71(8), 1724-1733.
- Sakai, S., & Yamanaka, K. (1968). Crystalline D-mannitol: NAD⁺ oxidoreductase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 151(3), 684-686.
- Sakamoto, K., Margolles, A., Van Veen, H. W., & Konings, W. N. (2001). Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. *Journal of bacteriology*, 183(18), 5371-5375.
- Sami, M., Yamashita, H., Hirono, T., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., & Yamasaki, M. (1997). Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 1-6.
- Schönberger, C., & Kosteletzky, T. (2011). 125th anniversary review: the role of hops in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 259-267.
- Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food research international*, 29(7), 675-690.
- Shen, B., Jensen, R. G., & Bohnert, H. J. (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant physiology*, 115(2), 527-532.
- Shiroza, T., & Kuramitsu, H. K. (1988). Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *Journal of bacteriology*, 170(2), 810-816.

- Sidebotham, R. L. (1974). Dextran. In *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (Vol. 30, pp. 371-444): Elsevier.
- Simpson, W. (1993a). Cambridge Prize Lecture. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *Journal of the Institute of Brewing*, 99(5), 405-411.
- Simpson, W. (1993b). Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. *Microbiology*, 139(5), 1041-1045.
- Smid, E. J. (1991). *Physiological implications of peptide transport in lactococci*.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Smit, B. A., Engels, W. J., Alewijn, M., Lommerse, G. T., Kippersluijs, E. A., Wouters, J. T., & Smit, G. (2004). Chemical conversion of α -keto acids in relation to flavor formation in fermented foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1263-1268.
- Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS microbiology reviews*, 29(3), 591-610.
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H.-M., Van Landschoot, A., . . . Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PloS one*, 9(4).
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., & Vandamme, P. (2015). The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food microbiology*, 49, 23-32.
- Stewart, G. G. (2017). *Brewing and Distilling Yeasts*: Springer.
- Stewart, G. G., Hill, A. E., & Russell, I. (2013). 125th anniversary review: developments in brewing and distilling yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(4), 202-220.
- Stoop, J. M., Williamson, J. D., & Pharr, D. M. (1996). Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, 1(5), 139-144.
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., & Kitamoto, K. (2008). Sake and beer spoilage lactic acid bacteria—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3), 209-223.
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., & Yamashita, H. (2006). A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(2), 173-191.
- Suzuki, K., Sami, M., Ozaki, K., & Yamashita, H. (2005). Comparative study of two plasmids, pRH45 and pRH 20690, isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45 and *L. lindneri* DSM20690T. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63(1), 11-16.
- Talarico, T. L., Axelsson, L. T., Novotny, J., Fiuzat, M., & Dobrogosz, W. J. (1990). Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1, 3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. *Applied Environmental Microbiology*, 56(4), 943-948.
- Tan, F., Wu, B., Dai, L., Qin, H., Shui, Z., Wang, J., . . . He, M. (2016). Using global transcription machinery engineering (gTME) to improve ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Microbial cell factories*, 15(1), 4.
- Terra, W. R., & Ferreira, C. (2012). Biochemistry and molecular biology of digestion. In *Insect molecular biology and biochemistry* (pp. 365-418): Elsevier.

- Thakker, K. D. (1998). An overview of health risks and benefits of alcohol consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22, 285s-298s.
- Torino, M. I., Font de Valdez, G., & Mozzi, F. (2015). Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Frontiers in microbiology*, 6, 834.
- Usher, J. (2019). The Mechanisms of Mating in Pathogenic Fungi—A Plastic Trait. *Genes*, 10(10), 831.
- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A., . . . Siezen, R. J. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 111-121.
- Van Nederveelde, L., Verlinden, V., Philipp, D., & Debourg, A. (1997). Purification and characterization of yeast 3-methyl butanal reductases involved in the removal of wort carbonyls during fermentation *Proceedings of congress-Eruopean brewery convention* (Vol. 26, pp. 447-454): Oxford University Press.
- Van Veen, H. W., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., . . . Konings, W. N. (1996). Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10668-10672.
- Verstrepen, K., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Delvaux, F. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(3), 197-205.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of bioscience and bioengineering*, 96(2), 110-118.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(3), 303-313.
- Wainwright, T. (1973). Diacetyl—A review: Part I—Analytical and biochemical considerations: Part II—Brewing experience. *Journal of the Institute of Brewing*, 79(6), 451-470.
- Wang, J., Liu, L., Ball, T., Yu, L., Li, Y., & Xing, F. (2016). Revealing a 5,000-y-old beer recipe in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(23), 6444-6448.
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Willaert, R. (2007). The beer brewing process: Wort production and beer. *Handbook of Food Products Manufacturing, 2 Volume Set*, 443.
- Winkler, J. D., & Kao, K. C. (2014). Recent advances in the evolutionary engineering of industrial biocatalysts. *Genomics*, 104(6), 406-411.
- Wisselink, H., Weusthuis, R., Eggink, G., Hugenholtz, J., & Grobbsen, G. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 151-161.
- Yamauchi, Y., Okamoto, T., Murayama, H., Nagara, A., Kashiara, T., Yoshida, M., & Nakanishp, K. (1995). Rapid fermentation of beer using an immobilized yeast multistage bioreactor system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53(3), 245-259.

Bijlagen

Tabel 7: Resultaten analyse door AntonPaar Alcoolyzer beer analyzing-toestel voor de groei en fermentatie van een melkzuurbacterie (*Lactobacillus brevis*) en/of gist (*Fermentis SafAle T-58*) in wort (75 g/l wortextract). De negatieve controle bestond uit inoculatie van het wort met 100 µl van de 0,9% saline-oplossing.

	Tijd (d)	alcohol	Oorspronkelijk extract	Werkelijk extract	Schijnbaar extract	Densiteit	pH	kleur
		%V/V	%Plato	%m/m	%m/m			EBC
Gist	0	0,01	...	...	...	...	5,35	21,5
	1	0,24	10,09	9,73	9,64	1,03849	4,79	...
	2	3,30	...	...	...	...	4,25	...
	4	4,09	10,64	4,35	5,89	1,0123	4,12	28,6
Melkzuurbacterie + gist	0	0,01	10	10,08	10,1	1,04041	5,34	22,6
	1	0,19	10,05	9,76	9,69	1,03872	4,89	...
	2	2,57	9,56	5,64	4,69	1,01843	4,17	27,1
	4	3,95	10,23	4,19	2,74	1,0107	4,03	28,3
Melkzuurbacterie	0	0,01	10,05	10,13	10,15	1,04061	5,32	21,4
	1	0,01	10,06	10,13	10,15	1,04061	5,32	...
	2	0,02	10,1	10,18	10,19	1,04078	5,31	24,8
	4	0,00	...	...	...	...	5,3	...

Controle	0	0,02	10,08	10,16	10,18	1,04074	5,32	21,4
	1	0,01	10,02	10,1	10,12	1,04046	5,36	...
	2	0,01	9,95	10,03	10,05	1,0402	5,34	22,7
	4	0,01	9,16	9,24	9,26	1,03691	5,33	22,9

