

MİTOKONDİRİ VE MİTOKONDİRİYAL MUTASYONUN BİRA KALİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

MITOCHONDRIY AND THE EFFECT OF MITOCHONDRIAL MUTATION ON BEER QUALITY

Gülten YAĞMUR, Hasan TANGÜLER, Hüseyin ERTEN*

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

Geliş Tarihi: 28 Aralık 2006

ÖZET: Bira kalitesini etkileyen en önemli unsurlardan biri olan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) diğer mikroorganizmalar gibi mutasyona uğrayabilir. Mutasyonlar doğal olarak ortaya çıktığı gibi mutajen adı verilen kimyasal maddeler ve fiziksel uygulamalarla yapay olarak da oluşturulabilir. Bira mayasında en sık rastlanan ve kendiliğinden ortaya çıkan mutasyon, mitokondriyal mutasyondur. Böylece mitokondriyal DNA'sı eksik ya da mitokondriyal DNA'dan tamamen yoksun mutantlar meydana gelir.

Mitokondriyal mutasyona uğrayan bira mayasının fermantasyon hızı, çökelme yeteneği, etil alkol ve aroma maddeleri üretimi ve böylece elde edilen biranın kalitesi önemli derecede etkilenir. Bu nedenle bira üretiminde kullanılacak mayanın mutasyona uğramamış olması gerekir. Bu derlemede, mitokondriyal mutasyonun bira kalitesi üzerine etkisi ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Bira, bira kalitesi, mitokondri, mitokondriyal mutasyon, *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT: Like all other microorganisms, brewers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) which is one of the important factors affecting beer quality is susceptible to mutation. Mutations can arise from either spontaneously or artificially by chemical and physical treatments known as mutagen. The most frequently identified spontaneously arising mutation in brewers' yeast is mitochondrial mutation. So, mutants which are partially or complete lost of mitochondri occur.

In such mutants, the fermentation rate, flocculation, formation of ethyl alcohol and flavour components, therefore beer quality are significantly affected. In this paper, the effect of mitochondrial mutants on beer quality was overwiewed.

Keywords: Beer, beer quality, mitochondry, mitochondrial mutation, *Saccharomyces cerevisiae*

GİRİŞ

Bira, arpanın çimlendirilip kurutulması ile elde edilen maltın su ile belirli şartlar altında mayşelenmesi ve elde olunan şıranın şerbetçiotu ile kaynatıldıktan sonra, etil alkol fermantasyonuna terk edilmesi sonucu meydana gelen, etil alkol ve CO₂ içeren içkidir (1).

Bira kalitesini etkileyen unsurlardan en önemlisi kullanılan mayadır (2, 3). Bira endüstrisinde kullanılan iki maya türü vardır. Bunlar *Saccharomyces (S.) carlsbergensis (uvarum)* ve *S. cerevisiae*'dir. *S. carlsbergensis*, bir alt fermantasyon mayasıdır ve fermantasyonun sonunda kümeleşerek tankın altında toplanır. *S. cerevisiae* ise bir üst fermantasyon mayası olup, fermantasyon sırasında oluşan CO₂ kabarcıkları ile yükselerek kalın kahverengi bir tabaka şeklinde fermente olan şıranın üzerinde toplanır (4, 5). Ancak her iki türde yeni sınıflandırmada *S. cerevisiae* olarak adlandırılmıştır (6).

Bira mayasında en sık rastlanan ve doğal olarak kendiliğinden ortaya çıkabilen mutasyon mitokondriyal mutasyondur. Bu mutasyona mitokondriyal genomdan kaybolan büyük parçalar neden olur (7). Mitokondrisi mutasyona uğramış mayaya mitokondriyal (petite) mutant denir. Bu mutantlar mitokondri aktivitesindeki

*E-posta: herten@cu.edu.tr

eksikliklerle karakterize edilirler ve havalı ortamda solunum olayını tam olarak gerçekleştiremezler (8). Bira üreticileri kullandıkları maya suşlarının mutasyona uğramalarını istemezler (6, 9). Bira mayalarında alkol fermentasyonu sırasında mitokondriyal mutant oluşum oranı %0.5-5.0 arasında değişir. Sıcaklığa ve kültür koşullarına bağlı olarak bu oran aynı maya suşu için %50'ye kadar çıkabilir (10).

Bu derlemede, bira üretiminde mitokondrinin rolü ve mitokondriyal mutasyonun bira kalitesi üzerine etkisi ele alınmıştır.

Mitokondri

Mitokondri, ökaryotik hücrelerin sitoplazmasında bulunan çomak ya da granül biçimindeki organeldir (11, 12). Maya hücresinde 4-24 arasında mitokondri bulunur (13). Mitokondrinin temel görevi, solunumda yer alarak hücrenin enerji ihtiyacını karşılamaktır. Mitokondride oksidasyon ve fosforilasyon için gerekli olan bütün enzim ve koenzimler bulunur (14).

Membran taşıma enzimleri ve fosfolipit biyosentezine ait enzimler dış zarda yer alırlar. Elektron taşınması ve oksidatif fosforilasyonda yer alan enzimler ise iç zarda bulunurlar. Mitokondrilerin matriksi de çeşitli enzimlerce zengindir. Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü ve yağ asitlerinin yıkımında rol oynayan enzimlerin çoğu matrikstedir (15, 16, 17). Anaerobik şartlar altında mitokondride oksidatif metabolizma ile ilgili enzimler bulunmaz (18). Öte yandan, mitokondriyal DNA (mtDNA) ergosterol ve doymamış yağ asitlerinin sentezinde, şeker taşıma sistemleri ve hücre yüzeyinde meydana gelen diğer maya aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynar (19).

Bira Üretiminde Mitokondrinin Rolü

Fermentasyon sırasında, fermentasyon performansı ve son ürünün kalitesinde rol oynayan bazı olaylar mitokondride gerçekleşir. Mitokondri havalı koşullarda oksidatif ATP sentezinde rol oynar (15, 20, 21). Öte yandan, havasız koşullarda mitokondrinin doymamış yağ asitleri ve membran lipitlerinin sentezinde, etil alkol ve şekerin oluşturduğu strese karşı hücrenin ortama uyumunda, çökme yeteneği ve hücre bölünmesinde gerekli olan hücre yüzeyi karakteristiklerinin düzenlenmesinde, aminoasit, dekarboksilik asit, pürin ve pirimidin bazlarının sentezinde, fermentasyonun başında lipit sentezi için gerekli olan glikozun glikojenden oluşumunda ve aroma maddelerinin üretiminde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu nedenlerden dolayı mitokondri alkol fermentasyonu için de önemlidir (15).

Şıradaki bulunan şeker miktarının mitokondri üzerine önemli etkisi vardır. Şıradaki başlangıçta yüksek miktarda bulunan glikoz, TCA döngüsü enzimlerinin, elektron taşıma sisteminde yer alan bileşiklerin ve mitokondrinin tamamen oluşmasını oksijen varlığında dahi engeller ve maya fermentasyon yolundaki enzimlerin sentezine devam eder. Bu olaya Glikoz ya da Crabtree etkisi denir (22, 23, 24). Glikoz miktarı %0.6'nın altına düştüğünde mitokondri tam olarak gelişir. Mitokondrinin tam olarak gelişmesi için aynı zamanda oksijene ihtiyaç vardır. Ancak bira üretiminde şıradaki oksijen, mayanın aşılmasından sonra 6 saat içerisinde tükenir (25,26). Oksijen miktarının yetersiz olması durumunda hücre zarı için önemli olan sterol ve doymamış yağ asitleri sentezlenemez (27). Ortamda oksijen olduğunda ilk bir saat içinde solunum zinciri bileşikleri (sitokromlar) oluşurken üç saat sonra mitokondrinin iç zarı gelişir (25).

Hücre zarının bileşiminde bulunan önemli maddeler doymamış yağ asitleri ve sterollerdir. Doymamış yağ asitlerinin en önemlileri palmitoleik ve oleik asitlerdir. Maya hücresinde en çok bulunan steroller ise ergosterol ve zymosteroldür (18). Bu maddelerin şıradaki miktarı maya için yeterli değildir ve bunların maya hücresi tarafından sentezlenmesi gerekir (17, 28). Mitokondri, yağ asidi ve ergosterol biyosentezinde rol oynar. Yağ asitleri ve sterolün sentezi için öncelikle pirüvatın asetil-CoA'ya dönüşmesi gerekir. Bu işlem de mitokondri içinde gerçekleşir (29). Fermentasyonda amino asit metabolizması da önemlidir. Amino asit metabolizmasının büyük bir kısmı sitoplazmada meydana gelir. Amino asitlerin keto asitlere dönüşümü ise mitokondride gerçekleşir. Keto asitler ise yüksek alkollerin öncül maddeleridir (6, 30).

Mutasyon

Mutasyon, DNA'nın nükleotid sırasında oluşan değişim olarak tanımlanabilir. Mutasyonlar doğal yani kendiliğinden meydana gelebilir ya da mutajen adı verilen kimyasal maddeler (nitroz asidi, akridin, pürin ve pirimidin analogları vb.) ve fiziksel uygulamalarla (UV-ışınları, x ışınları, ısı vb.) yapay olarak da oluşabilir (9, 31). Mutasyon oluşumunun farklı nedenleri vardır. Doğal mutasyonlar DNA polimeraz ve rekombinasyon enzimleri gibi enzimlerin işlevinde meydana gelen hatalar sonucu oluşur. Bu mutasyonların oluşum oranı organizmanın gelişme şartlarına bağlı olarak 10^{-8} ile 10^{-10} arasında değişir ve ayrıca mutajenler kullanılarak da bu oran önemli ölçüde artırılabilir. Genom mutasyonları, kromozom sayısında değişikliklere neden olurken, kromozom mutasyonları kromozomdaki genlerin sırasını değiştirebilir. Öte yandan, genlerde en sık görülen nokta mutasyonları ise genlerdeki baz sekanslarının değişmesine neden olabilir. Mikroorganizmalarda en sık görülen mutasyon türü ise nokta mutasyonlarıdır (32, 33). Bira mayasında fermantasyon sırasında doğal olarak mutasyonlar meydana gelebilir. Bunlardan biri de mitokondriyal mutasyondur (34).

Mitokondriyal Mutasyonun Bira Kalitesi Üzerine Etkisi

Mitokondriyal mutasyon bira mayasında oldukça sık rastlanan mutasyondur. Mayadaki mitokondriyal mutantlar ilk kez 1940'lı yılların sonunda Ephrussi tarafından tanımlanmış ve o zamanlardan beri bir çok araştırmanın konusu olmuştur. Mitokondriyal mutasyona mitokondriyal genomdan kopan parçalar neden olur. Bu parçaların büyüklüğü genom uzunluğunun %20'si ile %99'u arasında değişir (7, 34, 35). Mitokondriyal mutasyon sonucu mtDNA'sı eksik (ρ^-) ya da mtDNA'dan tamamen yoksun (ρ^0) mutantlar meydana gelir (36). Bu mutantlarda elektron taşıma zincirinde yer alan bir çok bileşik bulunmaz (18).

Mitokondriyal mutantların izolasyonu ve özelliklerinin belirlenmesi mitokondrinin hücredeki işlevi hakkında biyokimya ve moleküler biyoloji açısından önemli bilgiler sağlamıştır (15). Mitokondriyal mutantların mitokondrisi normal mitokondriden hem morfolojik hem de biyokimyasal olarak farklıdır. Bu mutantlarda en yaygın görülen eksiklik, aerobik hücrelerin mitokondrisinde bulunan ve oksidasyonda yer alan pigmentler olan sitokrom eksikliğidir (37).

Sitokrom içeriğindeki bu değişikliklerin yanısıra mitokondriyal mutantların enzim aktivitesinde de farklılık görülür. Mutasyonla enzim aktivitesi azalabilir ya da yok olabilir. Özellikle TCA döngüsündeki süksinik dehidrogenaz ve akonitik hidrotaz enzimlerinin aktiviteleri mitokondriyal mutasyondan çok etkilenirler (38).

Mitokondriyal mutantlar etil alkol, laktik asit ve gliserol gibi fermente olmayan karbon kaynaklarını kullanamazlar. Glikoz içeren agar üzerinde geliştirildiklerinde ise küçük koloniler oluştururlar (39, 40). Ayrıca mitokondriyal mutantlar tetrazolyum tuzunu kullanamadıkları için bu tuzun bulunduğu ortamda koloniler beyaz renkte görünürler (6, 39).

Mitokondriyal mutantların oluşumu akridin ya da etidium bromit gibi mutajenler kullanılarak da sağlanabilir. Bu mutajenler mitokondriyal DNA'nın tamamen kaybına neden olabilirler (25, 41). Sıcaklık artışları da zararlı özelliklerini etkileyerek mitokondriyal mutantların oluşumunu arttırabilir (42). Öte yandan, bileosin ve glutation bileşikleri *S. cerevisiae*'de mitokondriyal mutasyona neden olur (43). Kendiliğinden oluşan veya etidium bromit gibi mutajenlerle oluşumu yapay olarak teşvik edilen mitokondriyal mutantların gen dizilimleri ana suşdan oldukça farklıdır (44).

Mitokondriyal mutantlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 28°C'de geliştirilen mitokondriyal mutantlarda mitokondrideki protein sentezinin bir ara ürünü olan var1 proteinin oluşumunun azaldığı, 36°C'de ise bu proteinin oluşmadığı ve sitokrom oksidaz ve mitokondriyal ATPaz enzimlerinin de sentezlenemediği belirlenmiştir (45). Giudice ve ark. (36), yaptıkları çalışmada mitokondriyal mutantlarda mtDNA bulunmadığını ve genlerdeki değişiklikler sonucunda TCA döngüsündeki enzimlerin oluşmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca ribozomlarda ki protein sentezini engelleyen ve bir alkaloid olan lirozine karşı mtDNA'dan yoksun hücrelerin (ρ^0) daha dirençli olduklarını bulmuşlardır. mtDNA miktarının azalmasıyla ortaya çıkan mitokondriyal mutantlar ana suşa göre ısıya daha dirençlidir (20).

Mitokondriyal mutantların fazla sayıda bulunması teknolojik işlemlerde istenilmeyen sonuçlar ortaya çıkardığı için bu mutantların bira üretiminde kullanımının uygun olmadığı bildirilmiştir (10, 46).

Hücre zarının bileşiminde bulunan en önemli bileşikler arasında doymamış yağ asitleri ve steroller vardır. Bu bileşiklerin yetersiz miktarda sentezlenmesi hücre zarının yapısında ve zar ile ilgili işlemlerde değişikliğe neden olur ve hücre gelişimi yavaşlar (25, 47). Bu bileşiklerin sentezinde yer alan enzimlerin aktiviteleri mitokondriyal mutantların mitokondrisinde düşüktür. Bu da lipid sentezinin azalmasına neden olur. Öte yandan, bu maddelerin sentezi için ATP'ye ihtiyaç vardır. Mutasyon sonucu mitokondriyal ATP miktarının azalması da bu bileşiklerin sentezinde azalmaya yol açar. Mitokondriyal mutantlarda gelişme hızının düşük olmasının doymamış yağ asidi ve sterol biyosentezindeki azalmayla ilgili olduğu düşünülmektedir (42, 48).

Mitokondriyal mutasyonun fermantasyon performansı üzerine önemli etkisi vardır. Mitokondriyal fonksiyon kaybının fermantasyon başında hücre gelişimini engellemesi sonucu şırayı fermente edecek hücrelerin sayısında azalma görülür. Bu durum fermantasyon hızının azalmasına neden olur (8, 42). Mitokondriyal mutantların, kontrol suşlarına göre fermantasyon hızının daha düşük olduğu ve bu mutantlarla üretilen biralarda daha yüksek oranda şeker bulunduğu belirlenmiştir (38). Bunun nedeni, mitokondriyal mutantların çoğunun fermantasyon sırasında hızlı bir şekilde çökmesi ve şekerleri yavaş parçalamasıdır (3).

Mitokondriyal mutasyon oluşan alkol miktarını da etkiler. Böyle mutantlar maltotriozu fermente etme yeteneğini kaybederler. Buna karşın glikoz, fruktoz ve maltozu fermente etme yeteneklerinde ise bir değişme söz konusu değildir. Maltotrioz fermente edilemediğinden mitokondriyal mutantlarla elde edilen biranın etil alkol miktarı, ana suş ile elde edilene göre daha azdır (10, 49).

Mitokondriyal mutantlar üzerine yapılan çalışmalarda, *S. cerevisiae*'nin mitokondriyal mutantlarında çökme yeteneğinin değiştiği belirlenmiştir. Çökme mekanizmasını açıklayan değişik teoriler vardır. En çok kabul gören teoriye göre mayanın hücre duvarında bulunan lektin proteinleri Ca^{+2} varlığında, başka mayaların hücre duvarlarında bulunan mannozla etkileşime girer ve çökme gerçekleşir (6, 50). Gyllang ve Martinson (37), mitokondriyal mutantların fermente olan şırada süspansiyon halinde kalma yeteneklerini test etmişler ve mutantların çabuk çöktüğünü bulmuşlardır.

Ana maya ve bunun mitokondriyal mutantlarıyla üretilen biralardan aroması birbirinden farklıdır (46). Mitokondriyal mutantlarla elde edilen biralardan aroması tereyağimsı, karamel/toffee, aşırı tatlı, sabunumsu/yağlı olarak tanımlanırken, kontrol suşlarıyla üretilen biralardan aroması şerbetçiotumsu, çiçeğimsi/güzel kokulu olarak tanımlanır. Mitokondriyal mutantla üretilen biralarda diasetil ve 2,3-pentanedion miktarının yüksek olması güçlü tereyağimsı/toffee aromaya neden olur (39, 51).

SONUÇ

Bira mayasında en sık rastlanan mutasyon mitokondriyal mutasyondur. Bu mutasyon sonucu mitokondrisi kısmen veya tamamen uzaklaşmış mutantlar oluşur. Mitokondriyal mutasyona uğramış mayanın hücre gelişimi, fermantasyon hızı, çökme yeteneği, etil alkol ve aroma maddeleri oluşumu olumsuz yönde etkilenir. Böyle mutantlar bira üretimi için uygun değildirler. Mitokondriyal mutantlar üzerinde yapılacak çalışmalar bu konuya açıklık kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

1. Türker İ, Canbaş A. 2001. *Malt ve Bira Teknolojisi*. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Genel Yayın No: 4, Ders Kitapları Yayın No: A-2, 300 s. Adana.
2. Guido LF, Rodrigues PG, Rodrigues JA, Goncalves CR, Barros AA. 2003. The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food Chem*, 87: 187-193.
3. Walker G. 2004. The 4th brewing yeast fermentation performance congress, *FEMS Yeast Res*, 4 (4-5): 567-570.
4. Lewis JM, Young TW. 1995. *Brewing*. Chapman and Hall, 252 p, London.

5. Young TW. 1996. The biochemistry and physiology of yeast growth, In *Brewing Microbiology*, FG Priest and I Campbell (eds), pp. 13-42, Chapman and Hall, London.
6. Stewart GG, Russell I. 1998. *Brewing Science and Technology-Brewers Yeast*, The Institute of Brewing, 108 p, London.
7. Bernardi G. 1979. The petite mutation in yeast. *Trends in Biochem Sci*, 4:197-201.
8. Ernandes JR, Williams JW, Russell, Stewart GG. 1993. Respiratory deficiency in brewing yeast strains- effects on fermentation, flocculation and beer flavor components. *J Am Soc Brew Chem*, 51:16-20.
9. Ensari Y. 2002. *Moleküler Biyoloji*. Dicle Üniversitesi Basımevi Müdürlüğü, Diyarbakır.
10. Boekhout T, Robert V. 2003. *Yeast in Food: Beneficial and Detrimental Aspects*. Chapman and Hall, pp. 347-383, New York.
11. Ozban N. 1982. *Hücre-Sitoloji Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, No: 172, s. 77-89 , İstanbul.
12. Tuiete MF. 1989. Protein synthesis. In *The Yeasts: Metabolism and Physiology*, Second Edition, AH Rose and JS Harrison (eds), pp. 194-199, Academic Press, London.
13. Reed G, Pepler HJ. 1973. *Yeast Technology*. Avı Publishing ,Westport, Connecticut.
14. Houshmond M. 1999. *Mitochondrial DNA Mutations, Pathogenicity and Inheritance*. Göteborg University, Institute of Laboratory Medicine, Department of Curical Chemistry and Transfusion Medicine, Goteborg, Sweden.
15. Walker GM. 1999. *Yeast Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons, 321 p.
16. Scheffler, IE. 2001. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion*. 1(1) 3-31.
17. Russell I. 1995. Yeast. In *Handbook of Brewing*, William A Hardwick (ed), Marcel Dekker, pp. 169-202, New York.
18. Briggs DE, Boulton CA, Brookes PA, Stevens R. 2004. *Brewing Science and Practice*, Woodhead Publishing Limited, CRC Press, p. 881, Cambridge, England.
19. Jeunhomme CR, Dewerchin M, Carlier A, Masschelein CA. 1985. The potential of lager yeast mitochondrial DNA in the production of diacetyl negative mutants. *Eur Brew Conv Cong*, 283-290.
20. Sakaki K, Tashiro K, Kuhara S, Mihara K. 2003. Response of genes associated with mitochondrial function to mild heat stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem*, 134 (3) 373-384.
21. Rasmussen AK, Chatterjee A, Rasmussen LJ, Singh KK. 2003. Mitochondria-Mediated nuclear mutator phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Researchs*, Oxford University Press, 31 (14) 3909-3917.
22. Gancedo C, Serrano R. 1989. Energy yielding metabolism. In *The Yeasts*, Second Edition, 3:206-252.
23. Green PJ. 2002. *Introduction to Food Biotechnology*, pp. 182-195, CRC Pres.
24. Verstrepen KJ, Moonjai N, Bauer FF, Derdelinckx G, Dufuor JP, Winderickx JM, Thevelein JM, Pretorius IS, Delvaux FR. 2003 (b). Genetic regulation of ester synthesis in yeast: new facts, insights and implications for the brewer. In *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Katherine Smart (ed), pp. 234-247, Blackwell Science, London.
25. Hough JS, Briggs DE, Stevens R, Young TW. 1982. *Malting and Brewing Science, Volume II. Hopped Wort and Beer*, Second Edition, 914 p, Chapman and Hall, London.
26. Varnam AH, Sutherland JP. 1994. *Beverages: Technology, Chemistry and Microbiology. 2:* 296-352, Chapman and Hall, London.
27. Jones KL. 1985. Adaptation of fermentative organisms to alcoholic environments. In *Alcoholic Beverages*, GG Birch and MG Lindley (eds), Elsevier Applied Science, pp. 171-177 London.
28. Berry DR, Slaughter JC. 2003. Alcoholic beverage fermentations. In *Fermented Beverage Production*, 2nd edition, Andrew GH Lea and John R Piggott (eds), pp. 25-39, Kluwer Academic, New York.
29. Ratledge C, Wynn JP. 2000. Understanding microbial obesity. *SIM News, The Official News Magazine of the Society for Industrial Microbiology*, 50 (4) 181-185.
30. Berry DR, Watson, DC. 1987. Production of organoleptic compounds. In *Yeast Biotechnology*, DR Berry, I Russell and GG Stewart (eds), pp. 345-368, Allanand Unwin, London.
31. Thieman WJ, Palladino MA. 2004. *Introduction to Biotechnology*, Pearson, Benjamin Cummings (ed), pp. 45-49.
32. Groth C, Petersen RF, Pi J. 2000. Diversity in organization and the origin of gene orders in the mitochondrial DNA molecules of the genus *Saccharomyces*. *Mol Biol Evol*, 17: 1833-1841.
33. Crueger W, Crueger A, 1990. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Second Edition, Sinauer Associates Inc, p. 357, Sunderland.
34. Netter P, Robineau S. 1989. The differential overamplification of short sequences in the mitochondrial dna of *rho*-petites in *Saccharomyces cerevisiae* stimulates recombination. *Gene*, 83 (1) 25-38.

35. Bingham CG, Nagley P. 1983. A petite mitochondrial DNA segment arising in exceptionally high frequency in a *mit*-mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 740 (1) 88-98.
36. Giudice LD, Massardo DR, Pontieri P, Wolf K. 2005. Interaction between yeast mitochondrial and nuclear genomes: null alleles of *rtg* genes affect resistance to the alkaloid lycorine in rho⁰ petites of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene: Cross-Talk Between Nucleus and Organelles*, 354: 9-14, Elsevier BV, London.
37. Gyllang H, Martinson E. 1971. Properties of some spontaneous mutants from brewers yeast with increased sedimentation rate. *Proc Eur Brew Conv*, pp. 265-271.
38. Silhankova L, Savel J, Mostek J. 1970 (a). Respiratory deficient mutants of bottom brewer's yeast. I. Frequencies and types of mutant in various strains. *J Inst Brew*, 76 : 280-288.
39. Kennedy AI, Taidi B, Aitchison A, Green X. 2003. Management of multi-strain, multi-site yeast storage and supply. In *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Katherine Smart (ed), pp. 131-137, Blackwell Science, London
40. Stuart GR, Santos JH, Strand MK, Houten BV, Copeland WC. 2005. Mitochondrial and nuclear DNA defects in *Saccharomyces cerevisiae* with mutations in DNA polymerase associated with progressive external ophthalmoplegia. *Human Molecular Genetics*, 15 (2) 363-374.
41. Fayeulle JP. 1985. Effets de la phase gazeuse de fumée de cigarette sur l'induction de la mutation mitochondriale petite colonie par le bromure d'éthidium chez la levure. *Mut Res*, 158 (1-2) 69-75.
42. Pearson S. 1996. Fermentation with Petite Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Honours Project, p. 47, Heriot-Watt University, UK.
43. Poli P, Buschini A, Candi A, Rossi C. 1999. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome p-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*, UK Environmental Mutagen Society, Oxford University Press, 14(2) 233-238.
44. Fonty GF, Culard F, Baldacci G, Goursot R, Prunell A, Bernardi G. 1979. The mitochondrial genome of wild-type yeast cells VIII. The spontaneous cytoplasmic "petite" mutation. *J Molec Bio*, 134 (3) 493-537.
45. Murphy M, Choo KB, Macreadie I, Marzuki S, Lukins HB, Nagley P, Linnane AW. 1980. Biogenesis of mitochondria: a temperature sensitivity mutation affecting the mitochondrially synthesized var1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arc Biochem Biophys*, 203(1):260-270.
46. Silhankova L, Mostek J, Savel J, Salinova H. 1970 (b). Respiratory deficient mutants of bottom brewer's yeast. II. Technological properties of some Rd mutants. *J Inst Brew*, 76: 289-295.
47. Moonjai N, Verstrepen KJ, Delvaux FR, Derdelinckx G, Verachtert H. 2003. Unsaturated fatty acid supplementation of stationary-phase brewing yeast and its effects on growth and fermentation ability. In *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Second Edition, Katherine Smart (ed), pp. 110-119, Blackwell Science.
48. Quérin, B. 1991. Mitochondria. In *The Yeasts*, Anthony H Rose and J Stuart Harrison (eds), pp. 541-600, Vol 4, Second edition, Academic Pres, London.
49. Hammond JRM. 1996. Yeast Genetics. In *Brewing Microbiology*, Second Edition, FG Priest and I Campbell (eds), pp. 43-75, Chapman & Hall, London.
50. Finn DA, Stewart GG. 2002. Fermentation characteristics of dried brewers yeast: effect of drying flocculation and fermentation. *J Am Soc Brew Chem*, 60 (3) 135-139.
51. Morrison KB, Suggett A. 1983. Yeast handling, petite mutants and lager flavour. European Brewery Convention Congress, pp. 489-496, London.