

Produksi β -Glukan *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media dengan Sumber Nitrogen Berbeda pada *Air-Lift Fermentor*

β -Glucan production of *Saccharomyces cerevisiae* in medium with different nitrogen sources in air-lift fermentor

AHMAD THONTOWI, KUSMIATI[✉], SUKMA NUSWANTARA

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16911.

Diterima: 06 Agustus 2007. Disetujui: 25 September 2007

ABSTRACT

β -Glucan is one of the most abundant polysaccharides in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. The aim of this research is to explore an alternative nitrogen sources for β -glucan production. *S. cerevisiae* were grown in fermentation medium with different nitrogen sources. Peptone 2%, glutamic acid 0,5%, urea 0,2%, and diammonium hydrogen phosphate (DAHP) 0,02% were used for nitrogen source in the medium. A two liter air-lift fermentor was used in the fermentation process for 84 hours (T = 30°C, pH 7, and 1.5 vvm for the aeration). During the fermentation, optical density, extraction of β -glucan, glucose and protein in hydrolysate cultured were determined. β -glucan production level is similar with the growth rate of yeast and followed by decreasing glucose and protein content in hydrolysis cultured. The highest and lowest β -glucan content were obtained from peptone (933.33 mg/L) and glutamic acid (633.33 mg/L) as a nitrogen source in cells cultured after fermentation completed respectively. Yeast cells cultured with urea and DAHP as a nitrogen source give the same content of β -glucan about 733.33 mg/L. β -glucan concentration produced in medium with urea was a higher than that produced using glutamic acid and DAHP as a nitrogen source. The result indicated that urea can be used as an alternative nitrogen source for the production of β -glucan. Urea is easily available and cheaper than peptone, glutamic acid and DAHP.

© 2007 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

Key words: β -glucan, *Saccharomyces cerevisiae*, air-lift fermentor.

PENDAHULUAN

β -Glukan merupakan homopolimer glukosa yang diikat melalui ikatan β -(1,3) dan β -(1,6)-glukosida (Ha *et al.*, 2002) dan banyak ditemukan pada dinding sel beberapa bakteri, tumbuhan, dan khamir (Hunter *et al.*, 2002). *Saccharomyces cerevisiae* termasuk khamir uniseluler yang tersebar luas di alam dan merupakan galur potensial penghasil β -glukan, karena sebagian besar dinding selnya tersusun atas β -glukan (Lee *et al.*, 2001). Mikrobia ini bersifat nonpatogenik dan nontoksik, sehingga sejak dahulu banyak digunakan dalam berbagai proses fermentasi seperti pada pembuatan roti, asam laktat, dan alkohol (Lee 1992).

β -Glukan terbukti secara ilmiah sebagai *biological defense modifier* (BDM) dan termasuk kategori *generally recognized as safe* (GRAS) menurut FDA, serta tidak memiliki toksisitas atau efek samping (Ber, 1997). β -Glukan memiliki berbagai aktivitas biologis sebagai antitumor, antioksidan, antikolesterol, anti penuaan dini, dan peningkat sistem imun (Kulickie *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2001; Miura *et al.*, 2003). Selain itu, senyawa ini dapat juga dimanfaatkan sebagai zat aditif dalam industri makanan (Cheeseman &

Brown, 1995). Dengan banyaknya manfaat senyawa tersebut bagi manusia, menjadi dorongan bagi peneliti untuk mengembangkan β -glukan, meningkatkan produksi dan aplikasinya.

Formulasi media merupakan tahap yang penting dalam proses fermentasi β -glukan, sehingga biaya pembuatan media merupakan faktor penting bagi aspek ekonomi suatu proses produksi. Dalam industri fermentasi diperlukan substrat yang murah, mudah tersedia, dan efisien penggunaannya. Pepton merupakan sumber nitrogen yang sering digunakan dalam proses fermentasi, termasuk pada produksi β -glukan. Namun, harganya relatif mahal untuk produksi skala industri, sehingga diperlukan alternatif sumber nitrogen yang lebih murah dan lebih mudah tersedia.

Pada proses fermentasi β -glukan digunakan fermentor *air lift*. Fermentor jenis ini sangat umum digunakan, karena bersifat sederhana, memiliki transfer panas yang baik, dan memiliki efisiensi absorpsi gas yang tinggi (Bains, 1998; Lee, 1992). Selain itu, produksi glukan dengan menggunakan fermentor jenis ini menghasilkan sel yang tidak rusak serta tidak berubahnya morfologi. Apabila digunakan fermentor berpengaduk, maka sel akan rusak serta morfologi glukan akan berubah dan tidak kompak (Lee *et al.*, 2001).

Produksi β -glukan pada penelitian ini menggunakan berbagai sumber nitrogen yang berbeda dengan menggunakan fermentor. Sumber nitrogen yang digunakan yaitu pepton, asam glutamat, urea dan diamonium hidrogen fosfat (DAHP). Hal ini bertujuan untuk mencari sumber

✉ Alamat korespondensi:

Jl. Raya Bogor-Jakarta Km. 46, Cibinong-Bogor 16911
Tel. +62-021-8754587. Fax: +62-21-8754588
e-mail: kusmiati02@yahoo.com

nitrogen alternatif selain pepton untuk memproduksi β -glukan.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme

Jenis mikrobial yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Saccharomyces cerevisiae* RN4, koleksi Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong-Bogor.

Pembuatan media

Media yeast peptone glucose (YPG) cair dibuat dengan komposisi glukosa 2 g, pepton 2 g, dan ekstrak khamir 1 g. Semua bahan dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan untuk mempercepat kelarutan, lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media YPG padat dibuat dengan komposisi yang sama dengan media cair dengan tambahan 2 g agar bakteriologi.

Proses fermentasi

Proses fermentasi dilakukan sebanyak empat kali dengan menggunakan sumber N yang berbeda, yaitu: pepton 2%, asam glutamat 0,5%, DAHP 0,02%, dan urea 0,2%. Komposisi ini didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan yang mengawali penelitian ini (data tidak ditunjukkan). Media fermentasi cair sebanyak 1900 mL dibuat dengan komposisi glukosa 2%, ekstrak khamir 1%, dan sumber N. Semua bahan dilarutkan dalam air, dipanaskan sambil diaduk hingga homogen. Media dimasukkan ke dalam vessel (bejana fermentor), lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah preparasi fermentor, 100 mL prekultuur berumur 48 jam diinokulasikan. Fermentasi berlangsung selama 84 jam pada fermentor *air lift* skala 2 L dengan kondisi suhu 30°C, pH 7, dan aerasi 1,5 vvm (*volume per volume per minute*). Selama fermentasi berlangsung, dilakukan pengambilan sampel untuk analisis *optical density* (OD), kadar glukosa, kadar protein, dan ekstraksi β -glukan. Pengambilan sampel dilakukan setiap 2 jam sampai masa inkubasi 24 jam, dilanjutkan setiap 4 jam sampai masa inkubasi 48 jam, kemudian setiap 12 jam sampai masa inkubasi 84 jam. Parameter yang diamati ialah pertumbuhan *S. cerevisiae*, kadar glukosa, kadar protein, serta jumlah ekstrak β -glukan.

Analisis kimia

Analisis kimia meliputi pengukuran kadar glukosa dan protein dengan menggunakan spektrofotometer. Sampel kultur disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan sebagai sampel untuk uji kadar glukosa dan kadar protein. Analisis kadar glukosa menurut metode fenol-sulfat (Chaplin, 1986). Deret larutan baku glukosa dibuat dengan konsentrasi: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 dan 90 μ g/L. Sampel sebanyak 5 μ L ditambahkan 995 μ L akuades, lalu ditambahkan 500 μ L fenol 5%. Larutan ditambahkan 2,5 mL H₂SO₄ pekat, didiamkan selama 10 menit, lalu dicampur homogen. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 490 nm. Analisis kadar protein menurut metode Lowry (Copeland, 1951). Dibuat deret larutan baku standar BSA dengan konsentrasi 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, 450 dan 500 μ g/L. Sampel sebanyak 10 μ L ditambahkan 490 μ L akuades, ditambahkan 500 μ L NaOH 1M. Larutan dipanaskan selama 20 menit, didinginkan lalu ditambahkan 2,5 mL

larutan D (campuran antara 50 mL Na₂CO₃ 5%, 1 mL CuSO₄.5H₂O 1%, dan 1 mL potasium sodium tartrat 2%). Larutan didiamkan selama 10 menit, lalu ditambahkan 500 μ L larutan folin C (1:1). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 755 nm setelah 30 menit.

Ekstraksi β -glukan

Sampel kultur sebanyak 30 mL disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 20 menit pada suhu 15°C. Supernatan dibuang, pelet biomassa sel ditambahkan 5 mL NaOH 2%, lalu dipanaskan selama 5 jam pada suhu 90°C. Suspensi biomassa sel disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Ke dalam supernatan yang diperoleh ditambahkan CH₃COOH 2 M tetes demi tetes hingga pH larutan sekitar 6.8-7, setelah itu diendapkan dengan 3 volume etanol. Endapan yang terbentuk dipisahkan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Pelet yang terpisah dikeringkan, lalu ditimbang sebagai bobot β -glukan kasar.

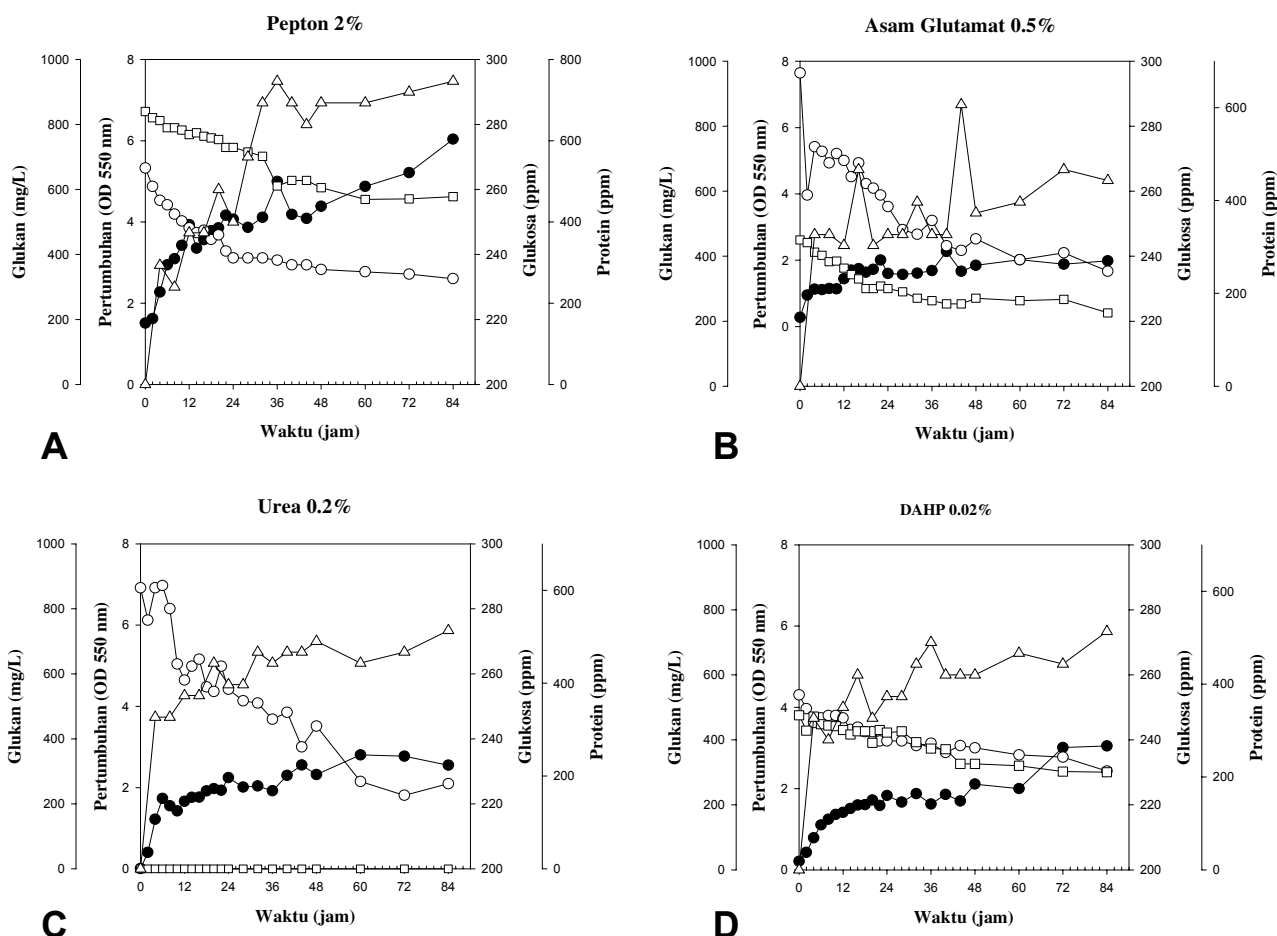
HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses fermentasi

S. cerevisiae RN4 dikulturkan pada media mengandung glukosa dan sumber nitrogen (sumber N) yang berbeda. Sumber N yang digunakan, yaitu: pepton 2%, asam glutamat 0,05%, urea 0,2%, dan diamonium hidrogen fosfat (DAHP) 0,02%. Hal ini dilakukan untuk mencari sumber N alternatif yang dapat digunakan untuk produksi β -glukan. Proses fermentasi dilakukan dengan metode kultur terendam pada fermentor *air-lift* skala dua liter. Metode ini terbukti lebih efisien dibandingkan metode lain, seperti metode kultur permukaan dengan media cair. Fermentasi terendam dilakukan dalam tangki tertutup (fermentor/bioreaktor) yang dilengkapi sistem aerasi dan agitasi. Dengan sistem ini, fermentasi dilakukan dalam waktu relatif lebih singkat dan terjaga dari kontaminasi (Rachman, 1989).

Fermentasi sistem tertutup ini berlangsung selama 84 jam pada suhu 30°C dengan aerasi 1,5 vvm. Menurut Walker (1995), pertumbuhan khamir maksimum terjadi pada hari ketiga. Berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan, pertumbuhan *S. cerevisiae* RN4 telah memasuki fase stasioner pada waktu fermentasi memasuki jam ke-14 (data tidak ditunjukkan). Data ini yang mendasari proses fermentasi dihentikan setelah 84 jam. Semakin lama waktu fermentasi, laju pertumbuhan spesifik mikrobial semakin menurun. Penurunan populasi mikrobial disebabkan berkurangnya nutrisi penting dalam media, hal ini terjadi karena mikrobial memanfaatkan senyawa yang terkandung dalam media untuk kebutuhan metabolismenya. Komposisi dalam media menjadi berubah sebagai hasil metabolisme mikrobial yang mendegradasi senyawa kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana.

Beberapa parameter yang diukur selama fermentasi, yaitu: pertumbuhan (OD), kadar β -glukan, kadar glukosa dan protein hidrolisat kultur. Perubahan-perubahan parameter yang terjadi pada setiap proses fermentasi ditunjukkan pada Gambar 1. Pada gambar tersebut terlihat pola perubahan parameter fermentasi hampir sama, dimana pola produksi β -glukan seiring dengan pola pertumbuhan *S. cerevisiae*. Hal ini diikuti dengan penurunan kadar glukosa dan kadar protein dalam kultur.



Gambar 1. Hasil pengukuran parameter fermentasi *S. cerevisiae* RN4 dalam fermentor *air-lift* skala 2 L, selama 84 jam dengan sumber N pepton 2% (A); asam glutamat 0,5% (B); urea 0,2% (C); dan DAHP 0,02% (D), pada kondisi suhu 30°C, pH 7, dan aerasi 1,5 vvm. (●) pertumbuhan pada OD_{550 nm}, (○) kadar glukosa, (□) kadar protein, (Δ) kadar β-glukan.

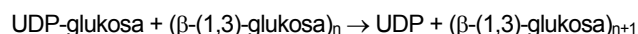
Pertumbuhan *S. cerevisiae*

S. cerevisiae RN4 ditumbuhkan dalam media yang mengandung sumber karbon glukosa dengan sumber nitrogen yang berbeda-beda. Meskipun demikian, *S. cerevisiae* memiliki pola pertumbuhan yang sama. Penggunaan media kultur inokulum yang sama dengan media fermentasi dapat mempersingkat fase adaptasi, sehingga pada tahap awal fermentasi, pertumbuhan *S. cerevisiae* langsung memasuki fase eksponensial. Selama fase ini, *S. cerevisiae* tumbuh pada laju pertumbuhan spesifik maksimum (Standbury dan Whitaker, 1984). Setelah 22 jam waktu fermentasi, pertumbuhan mulai memasuki fase stasioner. Pada fase stasioner, populasi sel mencapai maksimum dan tidak bertambah lagi (Lee, 1992), namun populasi masih aktif secara metabolik untuk memproduksi metabolit sekunder (Standbury dan Whitaker, 1984). Pada fermentasi di atas jam ke-48, kurva pertumbuhan cenderung meningkat. Keadaan ini dapat dijelaskan karena pada akhir fermentasi, kultur sudah banyak berkurang dan sel-sel yang mati cenderung mengendap sehingga aerasi sedikit terganggu. Hal ini dapat menyebabkan tidak homogennya kultur pada saat pengambilan sampel yang sangat mempengaruhi pengukuran turbiditasnya. Pengukuran pertumbuhan berdasarkan kekeruhan atau turbiditas media relatif cepat

dan mudah dilakukan, serta dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah dan massa sel, tetapi tidak dapat membedakan sel yang hidup dan sel yang mati (Lim, 1998). Dengan demikian, fase kematian yang ditandai dengan penurunan kurva pertumbuhan tidak terlihat.

Produksi β-glukan

β-1,3 dan β-1,6 glukon bersama-sama dengan kitin dan manoprotein merupakan komponen struktural dinding sel *S. cerevisiae* yang terikat secara kovalen (Ha *et al.*, 2002). β-1,3-glukan disintesis melalui reaksi enzimatis yang kompleks. β-Glukan sintetase yang berada di membran plasma (Lipke dan Ovalle, 1998) mengkatalisis sintesis β-glukan dari UDP-glukosa menurut reaksi sebagai berikut (Shematek *et al.*, 1980; Cabib *et al.*, 2001):



β-Glukan dapat diekstraksi dari dinding sel *S. cerevisiae* melalui ekstraksi basa, namun untuk mendapatkan β-glukan murni perlu dilakukan purifikasi lebih lanjut. Ekstraksi basa didasarkan pada sifat β-glukan yang mudah larut dalam basa (alkali). β-glukan diekstraksi menggunakan NaOH dengan bantuan panas, kemudian diendapkan dalam etanol sehingga diperoleh β-glukan kasar (Lee *et al.*, 2001). Bobot β-glukan kasar yang diperoleh selama fermentasi

S. cerevisiae pada media dengan sumber nitrogen berbeda dapat dilihat pada Gambar 1 (Δ).

Kadar β -glukan pada kultur cenderung meningkat pada awal fermentasi dan relatif tetap pada akhir waktu fermentasi. Kadar β -glukan paling tinggi diperoleh pada kultur dengan sumber N pepton dan terendah pada kultur dengan sumber N asam glutamat. Hasil ekstraksi β -glukan pada akhir fermentasi, yaitu: sebesar 933,33 mg/L dan 633,33 mg/L berturut-turut untuk kultur dengan sumber N pepton dan asam glutamat. Kultur dengan sumber N urea dan DAHP memberikan hasil akhir yang sama yaitu sebesar 733,33 mg/L. Berdasar hasil tersebut di atas, pepton merupakan sumber N yang bagus untuk produksi β -glukan, namun sebagai alternatif sumber N untuk produksi β -glukan, urea merupakan pilihan yang lebih baik dibandingkan DAHP. Urea lebih murah dan tersedia yang melimpah sehingga mudah didapat. Selain itu, berdasarkan hasil ekstraksi sampel media dengan sumber N urea sepanjang waktu pengambilan sampel menghasilkan kadar β -glukan yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan sampel media dengan sumber N asam glutamat dan DAHP. Penelitian sebelumnya telah dilakukan untuk memproduksi β -glukan menggunakan berbagai sumber C berbeda, bahkan memanfaatkan limbah pabrik gula (molase) sebagai media fermentasi (Kusmiati dkk., 2007). Dalam penelitian ini, fermentasi untuk memproduksi glukukan dilakukan dengan menggunakan *air lift fermentor*. Untuk menjaga agar tidak terjadi kontaminasi, satu-satunya sumber aerasi dan agitasi dilakukan dengan kolom udara dari aerator yang ditambahkan membran filter 0,25 μm untuk menjaga sterilitas kultur, jadi tidak dilakukan penambahan energi lainnya.

Kadar glukosa dan protein

Kebutuhan dasar nutrisi bagi mikroorganisme adalah energi atau sumber karbon, sumber nitrogen, dan unsur anorganik (Smith, 1990). Analisis kadar glukosa dan kadar protein dilakukan untuk mengetahui penyerapan nutrisi selama proses fermentasi. Pengukuran kadar glukosa menggunakan metode fenol sulfat dan kadar protein dengan metode Lowry.

Glukosa sebagai sumber karbon utama diserap melalui proses transfer aktif yang kemudian dimetabolisme untuk menghasilkan energi dan mensintesis bahan pembentuk sel, serta sintesis metabolit (Priest dan Campbell, 1996). Adanya penyerapan glukosa ini akan menyebabkan penurunan kadar glukosa dalam kultur selama fermentasi (Gambar 1, simbol \circ). Penurunan kadar glukosa terlarut dalam kultur *S. cerevisiae* mengindikasikan terjadinya penyerapan glukosa oleh mikrobia tersebut untuk kepentingan metabolisme dan pembentukan makromolekul (β -glukan), sehingga hasilnya meningkat.

Sumber nitrogen dalam media fermentasi digunakan untuk sintesis protein di dalam sel. Adanya penyerapan sel terhadap sumber nitrogen ini menyebabkan kandungan protein di dalam media semakin berkurang dengan lamanya waktu fermentasi (Gambar 1, simbol \square). Penurunan kandungan protein dalam kultur *S. cerevisiae* menunjukkan bahwa sumber N media yang dimanfaatkan oleh mikrobia lebih besar yang dibentuk. Protein yang terbentuk dapat merupakan enzim yang berperan dalam pembentukan β -glukan. Komposisi pepton yang kompleks menyebabkan kadar protein dalam media dengan sumber N pepton memiliki kadar protein yang lebih tinggi dibandingkan dengan kadar protein pada media lain.

KESIMPULAN

Pertumbuhan tertinggi *S. cerevisiae* RN4 ialah pada media fermentasi yang mengandung sumber nitrogen pepton. Kadar β -glukan pada akhir fermentasi pada sumber N pepton sebesar 933,33 $\mu\text{g/L}$, pada sumber N asam glutamat sebesar 633,33 $\mu\text{g/L}$, dan pada sumber N urea dan DAHP masing-masing sebesar 733,33 $\mu\text{g/L}$. Dengan demikian urea dapat dijadikan sumber N alternatif pengganti pepton (yang murah dan mudah diperoleh) untuk memproduksi β -glukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Nurfajriawati atas bantuan teknisnya di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Bains, W. 1998. *Biotechnology from A to Z*. Ed ke-2. New York: Oxford University Press.
- Ber, L. 1997. Yeast derived beta-1,3-D-Glucan: an adjuvant concept. *American Journal of Natural Medicine* 4 (3). www.anma.com/mon43.html.
- Berry, D.R. 1989. Growth of yeast. In: Neway, J.O. (ed.). *Fermentation Process Development of Industrial Organisms*. New York: Marcel Dekker.
- Cabib, E., D.H. Roh, M. Schmidt, L.B. Crotti, and A. Varma. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (3): 19679-19682.
- Chaplin, M.F. 1986. Monosaccharides. In: Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy (eds.). *Carbohydrate Analysis a Practical Approach*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.
- Cheeseman, I.M., and R.M. Brown, Jr. 1995. *Microscopy of Curdlan Structure*. Houston, TA.: Texas University Press.
- Copeland, R.A. 1951. *Methodes for Protein Analysis*. New York: Chapman & Hall.
- Ha, C., K. Lim, Y. Kim, S. Lim, C. Kim, and H. Chang. 2002. Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58 (3): 370-377.
- Hunter, K.W.Jr., R.A. Gault, and M.D. Berner. 2002. Preparation of microparticulate β -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Letters in Applied Microbiology* 35 (4): 267-269.
- Kulicke, W.M., A.L. Lettau, and H. Thielking. 1996. Correlation between immunological activity, molar mass, and molar structure of different (1,3)- β -D-glucans. *Carbohydrate Research* 297: 135-143.
- Kusmiati, Swasono R. Tamat, S. Nuswantara, dan Nita Isnaini. 2007. Produksi dan penetapan kadar β -glukan dari tiga galur *Saccharomyces cerevisiae* dalam media mengandung molase. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5 (1): 7-16
- Lee, J.M. 1992. *Biochemical Engineering*. New Jersey: Prentice Hall.
- Lee JN, Lee DY, In-Hye J, Gi-Eun K., and Kim HN. 2001. Purification of soluble β -Glucan with immuno-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 65 (4): 837-841.
- Lim, D. 1998. *Microbiology*. Ed ke-2. Boston: McGraw-Hill.
- Lipke, P.N., and R. Ovalle. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology* 80 (5): 3735-3740.
- Malherbe M. 2004. Modelling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological condition. *Biotechnology and Bioengineering*. 86 (3): 261-272.
- Miura, N.N, Y. Adachi, T. Yadomae, H. Tamura, S. Tanaka, and N. Ohno. 2003. Structure and biological activities of β -glucans from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *Microbiology and Immunology*. 47 (3): 173-182.
- Rachman, A. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Bogor: PAU IPB.
- Shematek, E.M., J.A. Braatz, and E. Cabib. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall: I preparation and properties of β -(1 \rightarrow 3) glucan synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*. 25 (3): 888-894.
- Smith, J.E. 1990. *Prinsip Bioteknologi*. [Penerjemah: Sumo, F.U., B. Sumantri, dan A. Subono]. Jakarta: Gramedia.
- Stanbury, P.F., and A. Whitaker. 1984. *Principles of Fermentation Technology*. Oxford: Pergamon Press.
- Walker, G.M. 1995. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Priest, F.G., and I. Campbell. 1996. *Brewing Microbiology*. 2nd ed. London: Chapman & Hall.