



1949

# **BORÁSZATI STARTERKULTÚRA FEJLESZTÉS A TOKAJI BORVIDÉKEN**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

a szerző neve: Kállai Zoltán

témavezető neve: Dr. Sipiczki Mátyás

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2024

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki doktori programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

*Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Debrecen, 2024.09.10.*

.....  
*a jelölt aláírása*

*Tanúsítom, hogy Kállai Zoltán. doktorjelölt 2010.- 2013. között a fent megnevezett Doktori Iskola Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Az értekezés elfogadását javasolom.*

*Debrecen, 2024.9.10.*

.....  
*a témavezető aláírása*

# BORÁSZATI STARTERKULTÚRA FEJLESZTÉS A TOKAJI BORVIDÉKEN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia. tudományágban

Írta: Kállai Zoltán okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája  
(Fermentációs Biotechnológiai és Biomérnöki programja) keretében

Témavezető: Dr. Sipiczki Mátyás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök:	Dr. Batta Gyula .....	.....
tagok:	Dr. Rakonczás Nándor .....	.....
	Dr. Váczy Kálmán.....	.....

A doktori szigorlat időpontja: 2015. november.13.

Az értekezés bírálói:

Dr. ....	.....
Dr. ....	.....
Dr. ....	.....

A bírálóbizottság:

elnök:	Dr. ....	.....
tagok:	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....
	Dr. ....	.....

Az értekezés védésének időpontja: 200.... . . . .

## TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés .....	1
2. Célkitűzés.....	5
3. Irodalmi áttekintés .....	7
3.1 A Tokaji borvidék bemutatása .....	7
3.2 A borászati fajélesztők és az irányított erjesztés .....	9
3.3 <i>Saccharomyces</i> nemzetség jellemzői .....	11
3.5 A <i>Saccharomyces</i> -ek taxonómiája .....	12
3.4 A <i>Saccharomyces</i> -ek borászati alkalmazása .....	14
3.6 A <i>Candida zemplinina</i> ( <i>Starmerella bacillaris</i> ) jellemzői .....	17
3.7. Az élesztőfajok identifikálása, a starterkultúrák beazonosítása .....	18
3.7.1. Taxonómiai identifikálás módszerei .....	18
3.7.2. Törzsek identifikálása és elkülönítése .....	21
4. Anyag és módszer .....	26
4.1 Felhasznált élesztőtörzsek .....	26
4.2 Táptalajok .....	32
4.3 Reagensek és oldatok .....	34
4.4 Makro- és mikromorfológiai vizsgálatok .....	36
4.5 Növekedési és asszimilációs vizsgálatok .....	37
4.6 A törzsek molekuláris taxonómiai meghatározása .....	38
4.6.1 Genomiális DNS izolálása .....	38
4.6.2 Az rRNS-eket kódoló szakaszok amplifikálása polimeráz láncreakcióval és a szekvencia analízise .....	39
4.6.3 PCR-ujjlenyomat módszerek .....	41
4.6.4 Elektroforetikus kariotipizálás .....	43
4.6.5 Mitokondriális DNS (mtDNS) kivonása és restrikciós analízise. ....	44
4.7 A törzsek fiziológiai vizsgálata .....	46
4.7.1 Sporulációs képesség meghatározása .....	46
4.7.2 A törzsek kénhidrogéntermelő képessége .....	46
4.7.3 A törzsek savtermelő képessége .....	47
4.7.4 Killer aktivitás vizsgálata .....	47
4.7.5 Ozmotikus tolerancia vizsgálata .....	48
4.7.6 Növekedési görbék felvétele optikai denzitás alapján .....	48
4.7.7 Erjesztési erély meghatározása a CO <sub>2</sub> elillanásából származó tömegvesztés mérésénél .....	49
4.8 A <i>C. zemplinina</i> versenyképességének vizsgálata a kevert starterkultúrákban .....	49
4.9 Mikrovinifikációs kísérletek .....	52
4.9.1 Mikrovinifikáció a Soós és Ásvány által izolált Tokaj törzsek vizsgálatához .....	52
4.9.2 Mikrovinifikáció a multistarterhez fejlesztéshez kiválasztott törzsek vizsgálatához .....	53

4.9.3 A próbaerjesztések kivitelezése .....	54
4.10. Klasszikus boranalitikai vizsgálatok .....	57
4.11 Műszeres analitikai módszerek .....	58
4.12 Organoleptikus bírálat.....	59
4.13 Statisztikai módszer: .....	60
5. Eredmények .....	61
5.1 A Soós és Ásvány. által izolált Tokaj törzsekre vonatkozó morfológiai, fiziológiai és genotipizálási eredmények .....	61
5.1.1 Morfológia .....	61
5.1.2 Spórázási képesség.....	69
5.1.3 Fiziológiai eredményeink.....	70
5.1.3.1 Kénhidrogén termelés .....	70
5.1.3.2 Savtermelés vizsgálata .....	70
5.1.3.3 Killer aktivitás.....	71
5.1.3.4 Ozmotolerancia vizsgálat.....	74
5.1.3.5 Erjesztési erély meghatározása a CO <sub>2</sub> elillanásából származó tömegveszteség mérése alapján .....	75
5.1.4 Mikrovínifikáció .....	78
5.1.5 A törzsek taxonómiája .....	85
5.2 A multistarter fejlesztés eredményei.....	100
5.2.1 A törzsek fiziológiai tulajdonságai .....	100
5.2.2 A törzsek hatása a borok érzékszervi tulajdonságaira.....	105
5.2.3 A törzsek killer aktivitása és szenzitivitása.....	106
5.2.4 A <i>Candida zemplinina</i> versenyképessége.....	107
5.2.5 A félüzemi erjesztési kísérletek eredményei.....	108
6. Eredmények megbeszélése .....	131
7. Összefoglalás .....	142
8. Summary .....	145
9. Köszönetnyilvánítás .....	147
10. Irodalom jegyzék .....	148
11. Mellékletek .....	164
12. Tudományos közlemények jegyzéke: .....	191

## 1. Bevezetés

A borkészítés története a civilizáció hajnaláig visszanyúlik. Archeológusok molekuláris bizonyítékot találtak alkoholos ital előállítására egy Jiahu nevezetű kínai neolitikus faluban, amit Krisztus előtt 7000-re datáltak (McGovern és Mtsi., 2004). A történészek úgy vélik, hogy a Kaukázus és Mezopotámia területén már Krisztus előtt 6000-ben készítettek bort, erről többek között egy ősi edényben talált borkősav nyomok tanúskodnak. Borkészítésről árulkodó utalásokat már Krisztus előtt 5000-ből találtak Egyiptom és Fónícia területéről, illetve Krisztus előtt 2000-ben már vannak utalások arról, hogy Görögországban és Krétán bort készítettek. A Római Birodalom terjedése által az egész Mediterráneum térségében elterjedt a borkészítés kultúrája. Krisztus előtt 500-ban már bort készítettek a mai Szicília, Olaszország, Franciaország, Spanyolország, Portugália és Észak Afrika területén. A rómaiak által a szőlőművelés a mai Balkáni államokra is kiterjedt, illetve Németországba és Észak Európa bizonyos részeibe is eljutott, majd végül elérte a majdani Nagy-Britanniát is. Az Új Világba európai felfedezők által került be a szőlő a 16. században. Végül Ausztráliába és Új Zélandra is telepítettek szőlőt az 1800-as évek elején. (McGovern, 2013)

Az ősi borkészítési módszereket tekintve nyilvánvaló, hogy a modern borászati technológia változatos borstílusokat eredményezett, de az alapelvek lényegesen nem sokat változtak. Az elmúlt 150 évben viszont a borkészítés tudományos háttere egyre világosabbá vált és sok olyan technika, ami ez idáig lehetetlennek tűnt az napjainkra rutinszerűvé vált.

Azt, hogy az alkoholos erjedésért az élesztők a felelősök 1836–37-ben egymástól függetlenül, a francia Charles Cagniard de Latour és a német Theodore Schwann és Friedrich Kützing állapította meg. Pasteur 1850 és 1860 között végzett kísérletei bizonyították, hogy az erjedés oka a mikroorganizmusok tevékenysége, ezzel megcáfolta mind az ősnemzés tanát, mind az erjedés kémiai elméletét (Schlenk, 1985). Pasteur további felfedezése lehetővé tette a nemkívánatos ecetesedést előidéző baktériumok elpusztítását. Ezeknek a tudományos eredményeknek a hatására a bortermelés minőségileg és mennyiségileg is jelentősen fejlődött.

A borok spontán erjedését eltérő élesztőfajok végzik. A mikrobiológia tudományának fejlődésével egyre inkább megismerték, hogy a különböző élesztők eltérő anyagcsere útvonalaik miatt miként befolyásolják a borok érzékszervi karakterét. (Fleet, 2003) Az erjedésért felelős mikrobióta összetételének aránya a borászati technológia során tápanyagigényük, ozmo- és alkohol toleranciájuk függvényében időben változik (Marsit és Dequin, 2015). Az eltérő élesztőfajok az alkoholos erjedés során különböző metabolitokat hoznak létre, amik javíthatnak, de ronthatnak is a borok érzékszervi értékén. (Romano, 2003).

A minőségi borkészítés iránti fokozott igény miatt a borélesztők kutatása egyre nagyobb hangsúlyt kapott. Felismerték, hogy az ellenőrizhető, célirányos erjesztés kiváló borászati tulajdonságokkal rendelkező élesztők tisztatenyészetével, ún. starterkultúrával érhető el, amivel általában a végtermék jobb minőségű, mint azok a borok, amik spontán erjedéssel készültek (Fleet és Heard 1993).

1889-ben publikálták először annak az eredményét, hogy tiszta élesztő kultúrával beoltva erjesztettek szőlőmustot (Müller-Thurgau, 1889), amikor

Müller-Thurgau meggyőzött néhány német bortermelőt a gyors és egyenletes fermentáció előnyeiről. De ez a technológia a gyakorlatban csak az 1970-es években terjedt el szélesebb körben (Hornsey, 2007). Az első két kereskedelmi, aktív szárított élesztő törzset egy kaliforniai borászati számára állították elő, és ezt a két törzset világszerte minden célnak megfelelő élesztőként kínálták (Degre 1993). Sikerük korlátozott volt, hiszen hamar nyilvánvalóvá vált, hogy a különféle *Sacharomyces cerevisiae* törzsek sajátos tulajdonságokkal rendelkeznek, így a különböző bortípusokhoz illetve az eltérő stílusú borokhoz bizonyos törzsek jobban megfelelnek.

A múlt század elején a franciaországi La Claire Intézet megkezdte a tiszta élesztő törzsek izolálását, fenntartását és kisüzemi termelését. A kereskedelemben előállított kultúrákat, amelyek készen álltak a nagy tartályok beoltására előzetes előkészítés és léptéknövelés nélkül, először az 1950-es években javasolták. A borélesztők ipari termelése, amilyen formában azt ma ismerjük, az 1960-as években kezdődött, amikor a pékségek élesztőinek különböző gyártói hasonló eljárással kezdték termelni a borélesztőket. Ez a termék a préselt, (tömb) nyers élesztő jellemzőivel rendelkezett, beleértve a 70%-os nedvesség tartalmat is. Habár relatív egyszerű volt használni a szavatossági idejük rövid volt. 1964 körül történtek meg az első erőfeszítések, hogy kifejlesszék a sokkal stabilabb terméket, az aktív szárított élesztőt, mint megoldást a problémára (Gonzalez és Mtsi., 2011).

Noha vannak kereskedelmi starterkultúrák, amik végrehajtják a must fermentációját, de úgy gondolják, hogy a helyi szelektálású élesztők sokkal hatékonyabbak a helyi borok erjesztésében (Degre 1993, Querol és Mtsi., 1992). A helyi élesztők feltételezhetően versenyképesebbek, mivel jobban

akklimatizálódtak az adott környezeti feltételekhez. Ezért jobban tudnák uralni a fermentációt, és a borkészítésért felelős legfontosabb biológiai szereplőjévé válhatnak (Regodon és Mtsi., 1997).

A kereskedelmi starterkultúrák alkalmazásának további hátránya, hogy az adott törzsre jellemző fermentatív aromaanyagok csökkenteni fogják a borok egyedi jellegét, ezáltal uniformizálódni fognak a borok aromái. Egyre több tanulmány megállapítja, hogy a mikrobiális sokféleség limitálása korlátozza az érzékszervi jellemzőket és csökkenti a végtermék összetettségét. (Daenen és Mtsi., 2008; Domizio és Mtsi., 2007)

Csak 12 év telt el a Müller –Thurgau publikációja (Müller - Thurgau, 1889) után, amikor a Magyar Királyi Ampelológiai Intézet élesztőket izolált különböző magyar borvidékek bormintáiból. Magyarországon az Ampelológiai Intézet 1901 óta foglalkozott a magyar borvidékekről származó borélesztők begyűjtésével és azok vizsgálatával. Az izolálás óborokból, kiejedt borok seprőjéből, szőlőbogyókról és levelekről történt (Soós és Ásvány, 1950). Ezeknek a törzseknek egy részét megőrizte a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye.

## 2. Célkitűzés

Céljaink az alábbiak voltak:

1: az Ampelológiai Intézet kutatói által a Tokaji borvidékről begyűjtött Tokaj törzsek eddig publikált tulajdonságainak összegyűjtése, pontos taxonómiai meghatározása és fiziológiai tulajdonságuk újraértékelése.

Az izolátumok pontos, DNS alapú taxonómiai meghatározása, mivel azt izolálásukkor a kor technikai ismerete nem tette lehetővé. Fel szerettük volna térképezni a törzsek fiziológiai és genetikai diverzitását, illetve ezek lehetséges kapcsolatát. Illetve kíváncsiak voltunk, hogy a több mint 100 éven keresztül tartó mesterséges törzsfenntartás miként befolyásolhatta a törzsek borászati tulajdonságait, hogy ennyi idő után alkalmasak-e borok kieresztésére, esetleg borászati starterkulturaként felhasználhatóak-e?

2: Az Ampelológiai Intézet kutatói által a Tokaji borvidékről begyűjtött Tokaj törzsek erjesztési képességének vizsgálata mikrovínifikációs körülmények között.

A törzsgyűjteményekben tartott törzseket ritkán használják starterkulturaként, mivel a természetes populációk valódi sokféleségének csak kis töredékét képviselik, és általában rosszul teljesítenek a borászati erjesztésben. Alacsonyabb hatékonyságuk feltételezhetően a jó erjesztési képességek elvesztése miatt következik be, ami a jobb erjesztési teljesítményre irányuló nem szelektív körülmények között történő hosszan tartó tenyésztés eredménye, de ezt a hipotézist alátámasztó szilárd kísérleti bizonyítékokat még eddig nem mutattak be (Pizzaro és Mtsi., 2007).

### 3: Helyi szelektálású multistarter kultúra fejlesztése

Egy optimálisan lezajlott spontán erjedéssel elkészült bor aroma komplexitása gazdagabb, mint egy olyan bornak, amit egy faj tisztatenyészetével oltottak be, erjesztettek ki. Ez annak tudható be, hogy a spontán erjedést végző mikroba populáció gazdag fajszerű, aminek az összetételeidőben dinamikusan változik az alkotó fajok ozmotoleranciájuk, tápanyagigényük és alkohol toleranciájuk függvényében. A különböző élesztőfajok az alkoholos erjedés során eltérő metabolitokat, ún fermentatív aromákat hoznak létre, amik gazdagítják a bor aroma összetételét. Ezt a jelenséget modellezvén a starterkultúrákat gyártó és forgalmazó cégek felfigyeltek a nem-*Saccharomyces* fajokban rejlő lehetőségekre és a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő mellé egyéb vad élesztőket javasolnak együttes-, vagy egymást követő- beoltáshoz, hogy azok eltérő fermentatív aromakomponenseikkel gazdagítsák a bort.

Ezért a Tokaji borvidékre jellemző borélesztő fajokat feltérképezve kiválasztottunk két másik élesztőfajt a *Saccharomyces uvarum*-ot és a *Candida zemplinina*-t. A törzseik borászati tulajdonságait megvizsgáltuk, hogy alkalmasak lehetnek-e helyi szelektálású, kevert starterkultúrák létrehozásához annak érdekében, hogy a borok termőhelyére jellemző érzékszervi tulajdonságait méginkább fokozzák. Ezzel ki lehetne váltani a külföldi borvidékekről származó kereskedelmi starterkultúrák alkalmazását a helyi bortermelőknél.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1 A Tokaji borvidék bemutatása

Egyesek úgy vélik, hogy a borvidék földrajzi területén már 10 millió éve él szőlő. Bár a folyamatosság kétségbe vonható, az igaz, hogy érdekes fossziliákat találtak a termőterületen. Ezek a kőzetek a miocén korba kalauzolnak el minket. 1857-ben Erdőbénye határában találták meg a *Vitis tokaiensis* ősszőlő lenyomatát (Stur 1867). A bányászati tevékenységek során több olyan leletet is találtak, ami azt bizonyította, hogy a *Vitis teutonica* elterjedt volt a hegyvidéken, ami a *Vitis silvestris* és a *Vitis vinifera* őse (Andreánszky 1959). Mindazonáltal a napjainkig eltelt földtörténeti időszakok alatt folyamatosan változtak a terület geológiai és klimatikus adottságai.

Eddigi tudásunk alapján úgy gondoljuk, hogy a szőlőtermesztés a neolitikumban (i. e. 10000-4000) alakult ki a dél-kaukázusi régióban (McGovern és Mtsi., 2017), majd elterjedt az egész mediterrán térségben (McGovern 2013). Dél-Örményországban fedezték fel a világ legrégebbi ismert bortermelő létesítményét, amely 6100 évre nyúlik vissza (Bernard és Mtsi., 2011). Történelmi forrásokból tudjuk, hogy a Római Birodalomban, melynek határa a Duna volt, fejlett szőlőkultúra alakult ki (Dodd, 2020). A honfoglalók szókészletében megtalálhatók voltak a szőlő és a bor szavaink, illetve a hozzájuk köthető munkafolyamatok megnevezése. Történészek által elfogadott, hogy ezen a területen, illetve a Mátraalján és a Szerémségben kabarok telepedtek le, akik leginkább értettek a szőlőműveléshez (Zelenák, 2012).

A borvidéket igazoló első írásos források Könyves Kálmán király 1100-ban tartott tarcali zsinatjához köthetők. Itt született két törvény, ami a szőlőművelésre vonatkozott. A 12-13. század minőségi változást eredményezett, mert ebben az időszakban telepítettek be nyugati vinceréket. A tatárjárás hatására a szőlőültetvények elpusztultak, azokat újra kellett telepíteni. 14. századi mezővárosi dokumentumokban már névvel illetnek jól termő dűlőket. A 16. században alakult ki a tokaji bor és a borvidék fogalma. 1737-ben VI. Habsburg Károly a világon elsőként zárt borvidékké nyilvánította a borvidéket, miszerint más területről származó alapanyagot, mustot és vagy bort tilos volt feldolgozás céljára bevinni (Balassa 1991).

A borvidékre nagy csapást mért a filoxéra (*Viteus vitifoliae*) kártétele az 1880-90-es években, melynek hatására az ültetvények 80-90%-a elpusztult. Az újratelepítés az ellenálló amerikai alanyú nemes oltványokkal az 1900-as évek elején indult meg. Ekkor alakult ki a borvidékre jellemző fajtaválaszték. A szőlőterület több mint kétharmadán Furmintot, egyharmadán Hárslevelűt és kisebb részarányban Sárga muskotályt termesztnek. A három fő fajta mellett újabban a Zéta, Kabar és a Kövérszőlő is szerepet kap (Balassa 1991).

A borvidék területe 5500 hektár, amit a tokaji-zempléni hegyvonulatok szegélyeznek. Éghajlata kontinentális, ami kedvez a szőlő nemesrothadásának, aszúsodásának. Talaja változatos, a vulkanikus alapközetten Tokaj és Tarcal határában lösz borítottságú, míg a zempléni hegyvonulat lejtőin nehezen megmunkálható, kötött nyiroktalajok, agyagbemosódásos barna erdőtalajok találhatóak. A borvidék az UNESCO 2002-es döntése óta a Világörökség része (World Heritage Comitte 2002).

### 3.2 A borászati fajlesztők és az irányított erjesztés

A szőlőültetvényeken és magán a szőlő bogyón számtalan mikroorganizmus megtalálható. Viszont csekély azoknak a száma, amik ha belekerülnek a feldolgozás során a mustba, abban szaporodni, tartósan túlélni képesek. A must alacsony pH értéke (pH 3,0-3,8) erős szelekciós nyomást gyakorol a mikroorganizmusokra (Heard és Fleet, 1988). Amint az élesztők megkezdik anaerob energiatermelő anyagcseréjüket etilalkohol keletkezik, ami toxikus volta miatt tovább fogja szűkíteni a borban életképes mikrobák mennyiségét (Eperjesi és Mtsi., 1998). Az élesztőgombák a bor legfontosabb mikroorganizmusai, egyszerű eukarióta szervezetek.

Azok az élesztők, amik a szőlőbogyó felületén beérkeznek a borászati üzembe, vagy a feldolgozó gépeken megtelepedtek képesek arra, hogy az erjedést beindítsák, illetve megfelelő körülmények között véghez is vigyék azt. A folyamat során tápanyagigényük és a képződött alkohollal szembeni toleranciájuk függvényében a fajok egy folyamatosan változó, diverz populációt alkotnak (Fleet és Heard, 1993). Ez a folyamat a spontán erjedés. Az erjedésben résztvevő számos élesztőfajnak és azok enzimeinek köszönhetően a bor gazdag aromakomplexitásra tesz szert, mivel különböző élesztők eltérő szekunder metabolitokat, aromakomponenseket termelnek a fermentáció során (Charoenchai és Mtsi., 1997). Nem megfelelő minőségű alapanyag feldolgozása miatt, illetve helytelen borászati technológiai alkalmazása esetén előfordulhat, hogy a spontán erjedés lelassulhat, szélsőséges esetben teljesen elakadhat, vagy olyan erjedési problémák léphetnek fel, amik kellemetlen ízű, illatú aromák megjelenésével járhatnak.

A *Hanseniaspora* nemzetség tagjai az uralkodók a szőlőbogyó felületén, a teljes élesztő populáció 50-75%-át is kitehetik (Fugelsang és Edwards, 2007). A *Candida*-kal együtt ők dominálnak a spontán erjedés kezdeti szakaszában, őket követik a *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Meschnikowia* és *Pichia* fajok egészen addig a fázisig, amíg a képződött alkohol koncentráció el nem éri a 3-4 v/v%-ot (Fleet, 1993). Az erjedés utolsó szakaszában már alkohol toleráns fajokat találunk, leginkább dominánsak a *Saccharomyces* nemzetség fajai (Ribéreau-Gayon és Mtsi., 2006). Azonban más nem-*Saccharomyces* élesztőfajok, pl. *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspóra* és *Zygosaccharomyces* fajok is jelen lehetnek a fermentáció egész folyamata alatt, sőt a már elkészült borban is (Martini és Martini, 1990).

Az élesztők borászati szempontból lehetnek kedvező és káros, romlást okozó hatásúak. Számos környezeti tényező befolyásolja az élesztőpopuláció összetételét a spontán erjedés folyamán, emiatt is a nem irányítottan erjedt borok minősége évről-évre eltérő lesz.

Ilyen tényezők a szőlőfajta, hőmérséklet, csapadék és egyéb időjárási hatások, a talaj, a megtermékenyítés, az öntözés, a fitotechnikai és növényvédelmi műveletek, a növénypatogén gombák, rovarok és madarak által okozott fizikai sebzések. Továbbá a szüretelő eszközökön, ládákon és a beszállító konténereken is megtalálhatóak az élesztők, amik a szőlővel érintkezve máris mikrobiológiai aktivitásba kezdenek még mielőtt a szőlő a feldolgozó üzembe beérkezhetett volna (Fleet 2007). Ezért fontos a kíméletes szüret és a gyors, lehetőleg hűtött beszállítás. Ezekon felül tovább módosíthatják az élesztőközösség összetételét majd az üzemek higiéniés viszonyai, a must kezelése, tisztítása, kénezése és az esetleges beoltások.

Számos borászat attól függetlenül, hogy a spontán erjedés hosszabb ideig tart és a kimenetele is bizonytalanabb mégis vállalják a kockázatot az egyedi jellegű borok reményében. Úgy gondolják, hogy a spontán fermentációban résztvevő változatos élesztőpopulációk több glicerint és egyéb aroma komponenseket termelnek, amiktől a bor íze kerekesebb, gazdagabb lesz (Romano és Mtsi., 1992; Schütz és Gafner 1993; Lema és Mtsi., 1996; Egli és Mtsi., 1998). További előnyt jelenthet a zajos erjedést megelőző hosszabb lag fázis, mely során az oxigén reakcióba léphet az antocianinokkal és más fenolokkal még etanol hiányában, ami fokozza a színtabilitást a vörösborokban. A nagyüzemi borászatok, ahol követelmény az állandó magas és reprodukálható minőség, nem engedhetnek meg effajta kockázatot.

A magas minőségű borok készítésének igénye megkövetelte a borélesztők mélyrehatóbb kutatását. Felismerték, hogy reprodukálható, magas minőséget csak úgy érhetnek el, ha kiváló borászati tulajdonságokkal rendelkező élesztők tisztatenyésztésével, ún. starterkultúrával (aktív szárított élesztő formájában) végzik az alkoholos erjedést. Ez a gyakorlat, amely az 1970-es években alakult ki, lerövidíti a lag fázist, biztosítja a must gyors és teljes erjedését, és hozzájárul a sokkal jobban reprodukálható végtermék előállításához (Bauer és Pretorius, 2000).

### 3.3 *Saccharomyces* nemzetség jellemzői

A korábbi *sensu stricto* csoport tagjainak közös jellemzője, hogy oxigén mentes közegben is képesek energiát termelni és a cukrokat etanollá és CO<sub>2</sub>-vé átalakítani. Érdekes tulajdonságuk a karbon katabolit represszió, miszerint oxigén jelenlétében, ha magas koncentrációban van glükóz a

közegben, akkor a glükóz represszálo szénforrásként a légzési lánc enzimeit represszálja és az energiatermelő folyamat az erjedés marad (Özcan és Johnston, 1999). Az aerob körülmények között előforduló erjedést Crabtree effektusnak is szokták nevezni és az ezzel a sajátossággal rendelkező élesztőket Crabtree pozitív élesztőknek nevezik (Pronk és Mtsi., 1996).

Az emberiség az ősidők óta használja őket különböző élelmiszerek és alkoholos italok előállításához. Ennek az emberi hatásnak, úgynevezett domesztikációnak a következtében új fajok is keletkeztek a csoporton belüli fajok hibridizációja vagy ploiploidizáció révén.

A *Saccharomyces* nemzetség tagjaira a jó erjesztőképesség jellemző. Aszekszuális szaporodásuk szűk alapú multilaterális sarjadzással valósul meg. Sejtmorfológiájuk általában gömbölyű, ovális vagy hengeresen megnyúlt. Álhifát ritkán képeznek, de valódi hifázás soha nem jellemző rájuk. A vegetatív sejteik általában diploidok. Szekszuális ciklusuk során a vegetatív sejt közvetlenül alakul át tartós falú sporangiummá, melyben négy gömbölyű, vagy ovális, sima falú spóra képződik. Nitrátot nem képesek asszimilálni (Lodder és Kreger-van Rij 1952).

### 3.5 A *Saccharomyces*-ek taxonómiája

A *Saccharomyces* nemzetség a *Saccharomycetaceae* családba, a *Saccharomycetales* rendbe, a *Saccharomycetes* osztályba, a *Saccharomycotina* altörzsbe és az *Ascomycota*-k törzsébe tartozik (Lodder és Kreger-van Rij 1952, Suh és Mtsi., 2006).

Hansen 1904-es első taxonómiai összefoglalója óta a gombák rendszertana folyamatosan változásban van. A molekuláris taxonómiai technikák fejlődésével és az egyre több leírt új faj számának növekedésével

ez az átrendeződési folyamat egyre inkább felgyorsult és ez alól a *Saccharomyces* nemzetség sem kivétel.

Lodder és Kreger-van Rij 1952-es taxonómiai leírásában a nemzetség 30 fajt tartalmazott, a második kiadásban (Lodder 1970) már 41 fajra bővült. Szintén ebben az évben Van der Walt (1970) bevezette a *Saccharomyces sensu stricto* csoport fogalmát, amibe a jó erjesztőképességű fajokat sorolta, a többit a *sensu lato* csoportba vonta össze. Kurtzman és Robnett a 2003-as taxonómiai revíziójában a tág értelemben vett *Saccharomyces*-eket átsorolta egyéb taxonokba így a *sensu stricto* csoport elnevezés idejétmúlt fogalommá vált. 2011-ben a *Saccharomyces* nemzetség 7 „tisztá” fajt: *S. arboricola*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* és a *S. uvarum* és 2 hibridet, a *S. pastorianus/carlsbergensis*-t és *S. bayanus*-t foglalt magában (Vaughan-Martini és Martini, 2011). Még ebben az évben egy új *Saccharomyces* fajt írtak le *S. eubayanus* néven (Libkind és Mtsi., 2011). Majd 2017-ben még egy új fajjal a *S. jurei*-vel bővült a nemzetség (Naseeb és Mtsi, 2017).

A *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* és a *S. kudriavzevii* fajok leginkább természetes környezetből, nagyon ritkán antropogén környezetből izolálhatóak (Naumova és Mtsi, 2005; Naumov, 1986; Naumov és Mtsi., 1993; Naumov, 2000, B). Ezeket a fajokat izolálták már szőlőről is (Redzepovic és Mtsi., 2002). A *S. cariocanus*-t Braziliában *Drosophila* fajokról izolálták (Morais és Mtsi., 1992). Talajból és korhadásnak indult levelekről a *S. mikatae*-t (Yamada, 1993) és a *S. kudriavzevii*-t (Kaneko és Banno, 1991) izolálták.

A csoporton belül a *S. cerevisiae* a legismertebb és legelterjedtebb faj, amit az emberiség széleskörűen felhasznált bor, ale típusú (felső erjesztésű)

sör, szaké, és egyéb alkoholos italok erjesztéséhez, valamint kelesztett pékáruk készítéséhez. A *S. bayanus*-t első alkalommal sörből izolálták (Nguyen és Gaillardin, 2005), majd később erjedő borokból is (González és Mtsi., 2006). Gyakran lager típusú sörök erjesztéséhez alkalmazzák (Nakao és Mtsi, 2009). A *S. uvarum*-ot borok és ciderek erjesztéséből izolálták (Naumov és Mtsi, 2001, 2005). A fermentációs folyamatokban általában a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* törzsei dominálnak (Liu és Mtsi., 2017) és a különböző mozaikos genommal rendelkező *Saccharomyces*-törzsek, amelyek képesek alkalmazkodni a változásokhoz azáltal, hogy fiziológiájukat olyan folyamatok révén modulálják, mint a FAGE (fast adaptive genome evolution) (Sipiczki 2011).

A taxon egyes tagjai képesek egymással a természetben hibridizálni. Ezek a hibridek életképesek lehetnek, és fontos szerepet tölthetnek be az erjedések során (Antunovics és Mtsi., 2005). A sörgyártásban használják a *S. pastorianus* (syn. *S. carlsbergensis*) törzseit (Vaughan-Martini és Martini, 1987; De Sousa és Mtsi., 1995). Erjedő borokból gyakran izolálták a *S. cerevisiae* és a *S. bayanus*, illetve a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* fajok hibridjeit. Ma már jól tudjuk, hogy a *S. pastorianus* is *S. cerevisiae* és *S. bayanus* törzsek hibridje (Vaughan-Martini és Kurtzman, 1985; Vaughan-Martini és Martini, 1987; Masneuf és Mtsi., 1998). A típus törzsként leírt *S. bayanus* (CBS 380<sup>T</sup>) törzsről is megállapították, hogy *S. cerevisiae* és *S. uvarum* hibridje (Nguyen és Mtsi., 2000).

### 3.4 A *Saccharomyces*-ek borászati alkalmazása

Napjainkban a mustok szárított élesztő kultúrákkal („starter”) való beoltásával a fermentáció felgyorsítását, az erjedési folyamatok

ellenőrizhetővé tételét és befolyásolhatóságát érte el a biotechnológia (Bauer és Pretorius, 2000). A borászati starterkultúrák különböző élesztőtörzsek egy sejt tenyészetei, amelyeket különböző borvidékek mustjaiból, boraiból szelektáltak kiváló borászati tulajdonságaik alapján. Ezek a kultúrák a mustba oltva gyorsan és biztonságosan véghezviszik az alkoholos erjedést, tehát az irányított erjesztés alapvető eszközének tekinthetők. Amellett, hogy az élesztő elsődleges szerepet tölt be a glükóz és fruktóz hatékony átalakításában alkohorra kellemetlen mellékízek termelése nélkül, a mai borászok a speciális tulajdonságok széles skálájával rendelkező törzseket igényelnek, amelyeket az elkészítendő bor stílusának, valamint a borászati üzem műszaki követelményeinek megfelelően választanak ki.

A jó fajélesztőkkel szemben támasztott követelmények (Magyar 2010, Degre 1993, Rainiery és Pretorius, 2000, Coulon és Mtsi, 2006, Vinicius és Mtsi., 2020):

- az erjedés gyors megindítása
- magas erjedési hatékonyság
- magas alkohol kihozatal
- jó alkoholtolerancia
- magas ozmotolerancia
- alacsony hőmérséklet optimum
- jó kénessav tolerancia
- alacsony szulfit lekötő képesség
- mérsékelt habképzés
- tömör üledék képzése
- magas glicerinnel termelés
- alacsony illósav termelés

- alacsony acetaldehid termelés
- minimális kénhidrogén termelés
- alacsony karbamid képzés
- alacsony biogén amin termelés
- alacsony ethyl karbamát képzés
- magas genetikai stabilitás
- ellen álljon a szárításnak
- proteolitikus aktivitással rendelkezzen
- béta-glükózidáz aktivitással rendelkezzen
- módosított észteráz aktivitással rendelkezzen
- alacsony legyen a nitrogén szükséglete
- fokozott autolízis
- Speciális esetekben:
  - o neutrális erjedési aromaképzés
  - o killer aktivitással rendelkezzen

Meg kell jegyezni, hogy a *S. cerevisiae* starterkultúrák alkalmazása nem feltétlenül gátolja meg a vad *S. cerevisiae* törzsek, vagy a nem-*Saccharomyces* élesztők növekedését és metabolikus aktivitását. Általánosan elfogadott, hogy mind a spontán, mind a beoltott bor erjedését befolyásolja a szőlőültetvényhez és a borászathoz kapcsolódó élesztők sokfélesége.

A világ különböző bortermelő régióiban az élesztők biológiai diverzitásának gazdagsága a borászati potenciál szempontjából még mindig nagyrészt kihasználatlan. Mivel egyre több ismeretünk van a különböző fajok fiziológiai tulajdonságáról, felismerték az abban rejlő lehetőségeket, hogy a *S. cerevisiae* törzsek és a nem-*Saccharomyces* fajok keverékeit alkalmazzák

starterkultúrának (Jolly és Mtsi., 2014). Ezzel modellezve és ötvözve a spontán erjedés előnyös tulajdonságát (Egli és Mtsi 1998; Garcia-Rios és Mtsi., 2014). Ezzel egyidőben igény támadt az adott borvidéknek, akár dűlőnek és pincészetnek egyedileg megfelelő törzsek szelektálására és starterkultúrává nemesítésére.

### 3.6 A *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*) jellemzői

A tokaji borok mikrobiótájának tanulmányozása folyamán, Sipiczki (2003, 2004) számos törzset izolált a botrytizált mustok erjedése közben, melyeket klasszikus taxonómiai módszerekkel *C. stellata*-nak azonosított. Ezen törzseknek a további vizsgálata során figyeltek fel arra, hogy egyes törzsek kiemelkedőbb ozmotoleranciával és hidegtűréssel rendelkeznek, mint a *C. stellata* típustörzse (CBS 157). Továbbá a törzsek képesek voltak olyan magas glükóz koncentráció mellett is növekedni, ami a *C. stellata*-ra már gátlóként hat. A tokaji izolátumok morfológiájukban is eltértek a *C. stellata*-tól. Az eredmények alapján leírták a *C. zemplinina*, mint egy új ozmo- és pszichotoleráns, fruktofil és acidogén élesztőfajt, amely nagyfokú hasonlóságot mutat a *Candida stellata*-val. A további vizsgálatok alapján megállapították, hogy a *C. zemplinina* képes növekedni olyan magas glükóz koncentráció mellett is, mely már gátolta a *C. stellata*-t és a *S. cerevisiae*-t is. A *C. zemplinina* alacsony hőmérsékleten gyorsabban képes növekedni, mint a *C. stellata*, *S. cerevisiae* és *S. uvarum*. A *C. zemplinina* izolátumok etanol jelenlétében is képesek szaporodni, bár alkohol toleranciájuk nem vetekszik a *S. cerevisiae*-nek és a *S. uvarum*-nak az alkoholtűrésével, így nem számítanak igazi konkurenciának az erjedés során. A fentebb említett tulajdonságai miatt a közelmúltban egyre többen tartják potenciális

hasznos élesztőnek *Sacharomyces* élesztők beoltása mellé a borok összetettségének javítása és sajátos jellemzőinek kiemelése érdekében (Tofalo és Mtsi., 2009, 2012).

### 3.7. Az élesztőfajok identifikálása, a starterkultúrák beazonosítása

#### 3.7.1. Taxonómiai identifikálás módszerei

Az élesztők taxonómiai meghatározását kezdetben csak fiziológiai, biokémiai és morfológiai tulajdonságok és jellemzők alapján végezték (Kreger van Rij és Mtsi., 1984; Barnett és Mtsi., 1990; Kurtzmann és Fell., 1998).

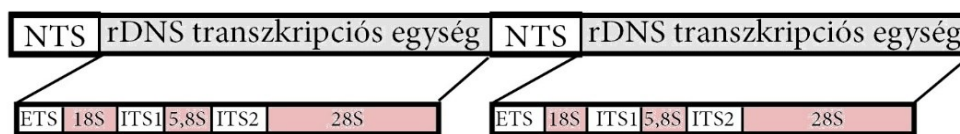
Az azonosításhoz leggyakrabban az alábbi módszereket alkalmazták: erjedési képesség különböző szénforrásokon, növekedés különböző szén- és nitrogénforrásokon, vitaminigény, növekedés különböző hőmérsékleten és magas cukor- vagy nátrium-klorid-koncentrációt tartalmazó táptalajon, karbamid-hidrolízis és antibiotikum-rezisztencia (Yarrow, 1998). A konvencionális módszerek időigényesek és fáradtságosak, a pontos meghatározáshoz 60-90 teszt elvégzése szükséges, mely két-három hétig is eltarthat. További hátránya, hogy olykor bizonytalan azonosítást tettek lehetővé, mert a tenyészet aktuális állapota befolyásolhatja az élesztők fiziológiai karakterét (Yamamoto és Mtsi., 1991). Ezeket a módszereket a sejtfehérjék vizsgálata, az izoenzimek profilozása és a zsírsavak gázkromatográfiás elemzése követte. Azonban ezeknek a technikáknak a reprodukálhatósága szintén némileg megkérdőjelezhető, mivel sok esetben az élesztősejtek fiziológiai állapotától függő markereket elemeznek (Golden Mtsi., 1994).

Mára sok új és pontosabb módszert fejlesztettek ki az élesztők pontos taxonómiai vizsgálatára, illetve törzs szintű azonosításukra a molekuláris biológiai technikákra alapozva. Ezeknek a módszereknek a megbízhatósága azon alapul, hogy közvetlenül a genomot elemzik, ezáltal függetlenek a sejtek fiziológiai állapotától.

A riboszómális DNS (rDNS) elemzésén alapuló módszerek:

A riboszómális gének (5.8S, 18S és 26S) tandem csoportosulnak, és olyan transzkripciós egységeket alkotnak, amelyek 100-200-szor ismétlődnek a genomban. Minden transzkripciós egység két másik régiót tartalmaz, a „internal transcribed spacer”-t (ITS) és az „external transcribed spacer”-t. (ETS)

Az 5.8S, 18S és 26S riboszómális gének, valamint az ITS és NTS („nontranscribed spacers”) spacerek szekvenciáinak konzerváltsága és összehangolt evolúciója azt jelenti, hogy egy adott fajon belül az ismétlődő transzkripciós egységek között nagyobb a hasonlóság, mint a különböző fajokból származó egységek között (Kurtzman és Robnett, 1998). Az ITS régió magába foglalja az 5.8 rRNS-t kódoló konzervatív gént és a két oldalról szegélyező ITS1 és ITS2 nem kódoló variábilis központi transzkripciós hézagokat (1. ábra). Ezek a régiók magas interspecifikus méretbeli variabilitást, de kis intraspecifikus polimorfizmust mutatnak. Erről az erősen konzervatív régióról amplifikált PCR termékek fajra specifikus méretűek (Guillamon és Mtsi., 1998).



## 1.ábra: A riboszómális DNS sematikus felépítése

### ITS PCR-RFLP módszer:

Előfordulhat azonban, hogy egyes élesztőfajok ITS PCR termékei hasonló méretűek. Ebben az esetben a pontos azonosítás ezzel az egy módszerrel lehetetlen. Erre a problémára és a jobb felbontás és végeredményben a biztosabb identifikálás érdekében a PCR-RFLP technikát dolgozták ki (Valente és Mtsi., 1996., Guillamon és Mtsi., 1998., Montrocher és Mtsi., 1998., Esteve – Zarzoso és Mtsi., 1999). A PCR-RFLP módszer hatékonynak bizonyult a *Saccharomyces sensu stricto* csoporton belüli fajok elkülönítésére és azonosítására (Guillamon és Mtsi., 1994; Oda és Mtsi., 1997; McCulloch és Mtsi., 1998). A módszer lényege, hogy a PCR- terméket különböző restrikciós endonukleázokkal emésztjük. Ezeknek az enzimeknek egyedi felismerési helyeik vannak, ahol hasítani képesek a DNS molekulát. Az PCR termékek emésztése eltérő számú és méretű fragmenteket eredményez a felhasznált endonukleázok függvényében. Ezek a fragmentek gélelektroforézissel szétválaszthatóak, vizualizálhatóak és méretük meghatározható. Az így kapott eredmények specifikusak és lehetővé teszik a pontos azonosítást.

### A riboszómális DNS (rDNS) szekvencia analízise:

Az élesztőfajokat elsősorban az rDNS-régiók nukleotidszekvenciáinak összehasonlításával szokták azonosítani, mert az ITS régió nukleotidszekvenciái sokszor fajon belül is variábilisak lehetnek. A 2 leggyakrabban használt régió a D1 és D2 régiók a riboszóma nagy alegységében található 26S riboszómális alegységeket kódoló gének 5' végén helyezkednek el. (Kurtzman és Robnet, 1998; James és Mtsi., 1997). A DNS

adatbázisokban megtalálható szekvenciákhoz hozzá illesztjük és összehasonlítjuk velük az ismeretlen törzsünk szekvenciáját. Ha a szekvencia azonosság értéke magasabb, mint 99%, akkor a találati faj típus törzsének szekvenciájának összehasonlításával tovább folytathatjuk az azonosítást. Nagyon fontos, hogy típus törzs-szekvenciákhoz hasonlítunk, mert az egyéb szekvenciák között sok az olyan, aminek a taxonómiai hovatartozása hibásan van megadva az adatbázisokban. Az elemzéseket az NCBI Blast algoritmussal végezhetjük el az NCBI GenBank adatbázisát felhasználva.

### 3.7.2. Törzsek identifikálása és elkülönítése

A fajon belül a törzsek eltérhetnek egymástól tulajdonságaikat tekintve. Ezért fontos, hogy legyenek olyan módszerek, amelyekkel el tudjuk különíteni a fajazonos, de eltérő törzseket egymástól. Többféle módszert is kidolgoztak már. Az alábbiakban a legelterjedtebbeket mutatom be.

A mitokondriális DNS restrikciós analízise:

Ez a módszer a kromoszómák elemzésével ellentétben univerzálisan, minden eukarióta faj esetében alkalmazható. A *S. cerevisiae* mitokondriális DNS-e (mtDNS) egy nagyon változatos, kicsi, 60 és 80 kb közötti méretű molekula. Az mtDNS restrikciós elemzése által feltárt nagyfokú polimorfizmus miatt ez az egyik leggyakrabban alkalmazott technika e faj törzseinek jellemzésére. Nem minden enzim mutat ugyanolyan mértékű polimorfizmust, és az emésztési minták erősen fajfüggőek. A *S. cerevisiae* esetében a törzsek megkülönböztetésére a legmegfelelőbb enzimek a HinfI és a HaeIII (Guillamon és Mtsi., 1994.). A módszer nem csak a *S. cerevisiae*

törzseinek megkülönböztetésére alkalmas, hanem nem-*Saccharomyces* fajok esetében is eredményesen használható (Csoma és Mtsi., 2018, 2020)

Polimorf DNS véletlenszerű amplifikációja (RAPD) (PCR-ujjlenyomat):

A mitokondriális DNS-en kívül a nukleáris DNS elemzésével is lehetséges törzseket megkülönböztetni egymástól. A RAPD-technikához (Williams és Mtsi., 1990) egyetlen rövid (kb. 10 nukleotidot tartalmazó) primert használnak, amely véletlenszerű szekvenciával rendelkezik. A primer rövide miatt ez a szekvencia nagy valószínűséggel található vele komplementer szekvenciákat a genomban, amelyekhez hozzákötődhet. Ha két ilyen szekvencia nincs túl távol egymástól, akkor a PCR reakció során egy fragmens másolat képződik a köztük levő DNS szakasról. Sok ilyen páros esetén sokféle fragmens képződik. A fragmensek számában és méretükben eltérhetnek a fajazonos törzsek is. A reakciót alacsony hibridizációs hőmérsékleten (34-37 °C) futtatják le. Így az oligonukleotid és a DNS közötti párosításokat a primer rövid és véletlenszerű szekvenciája határozza meg, aminek az alacsony hibridizációs hőmérséklet kedvez, ami a genomban eloszló DNS-fragmensek széles skálájának amplifikációjához vezet. Többféle hibridizációs hőmérsékleten végzett reakciók esetében a nem teljes komplementaritás esetében is kötődhet a primer, így képződhet amplikon, ami a módszer feloldó képességét növeli. Az eredmény a különböző molekulatömegű amplifikált termékek mintázata, amely jellemző lehet a fajra vagy ugyanazon fajon belüli a különböző törzsekre az eltérő genomszerkezetük miatt (Bruns és Mtsi., 1991).

A RAPD fő előnye, hogy a primer megtervezéséhez nincs szükség előzetes szekvenciainformációra. Továbbá, mivel a technika lehetővé teszi a teljes genom variabilitásának elemzését, több polimorfizmust tár fel, mint a

specifikus régiókat elemző módszerek. Hátrányaként elmondható, hogy az alacsony hibridizációs hőmérséklet miatt az amplifikációs profilok instabilak és nehezen reprodukálhatók, ezért minden egyes mintához ajánlatos több reakciót elvégezni, különböző extrakciókból származó DNS-t használva templátként.

Ismétlődő genomi DNS (mikroszatellitek és miniszatellitek) polimeráz láncreakció (PCR) elemzése:

A genomi DNS repetitív régióinak nagyfokú variabilitása alkalmassá teszi őket az élesztőtörzsek molekuláris azonosítására. Ezek a mikro- és miniszatellitként ismert motívumok hossza jelentősen eltér, és a genomban véletlenszerűen elszórt tandem ismétlődések formájában vannak jelen. A mikroszatellitek általában 10 bázispárnál rövidebbek, míg a miniszatellitek 10 és 100 bázispár közötti hosszúságúak. Az ezekben a régiókban található variabilitás specifikus primerekkel ((GTG)<sub>5</sub>, (GAG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub> vagy M13) végzett PCR-amplifikációval kimutatható. Legkorábban Lieckfeldt és Mtsi. (1993) írták le, hogy ezek az oligonukleotidok képesek az *S. cerevisiae* törzsek közötti polimorfizmus feltárására. A kapott amplifikált termékek körülbelül 700-3500 bázispár hosszúak, és ezért agaróz gélelektroforézis alkalmazásával egyszerűen láthatóvá tehetők.

A  $\delta$  szekvenciák amplifikációja:

Csak a *S. cerevisiae* törzsek elkülönítésére alkalmas módszer. A delta szekvenciák 0,3 kb-os elemek, amelyek a Ty1 retrotranszpozonokat szegélyezik (Cameron és Mtsi., 1979). A  $\delta$  elemnek mintegy 100 példánya van jelen kizárólag a *S. cerevisiae* genomban a Ty1 retrotranszpozonok részeként vagy izolált elemként. Ezen elemek száma és lokalizációja olyan mértékű intraspecifikus variabilitást mutat, amelyet Ness és munkatársai

(1993) arra használtak ki, hogy specifikus primereket fejlesszenek ki a *S. cerevisiae* törzsek megkülönböztetésére.

Amplifikált Fragment Hossz Polimorfizmus (AFLP):

Az AFLP magában foglalja a genomi DNS hasítását, majd az adapterek kötését a kapott fragmentumokhoz és azok PCR-rel történő szelektív amplifikációját. Az adapterszekvenciák és a hasító helyek együttesen szolgálnak a primerek célpontjaiként a PCR-amplifikáció során. A RAPD-hoz hasonlóan a primerek tervezéséhez nincs szükség előzetes szekvenciainformációra. A módszer könnyen reprodukálható és nagy felbontású információt szolgáltat. Az AFLP hasznos technika az élesztőtörzsek közötti különbségtételre (de Barros Lopes és Mtsi., 1999).

A kromoszómák szétválasztása váltakozó (pulzáló) erőterű gélelektroforézissel:

Ez a módszer olyan fajok esetében alkalmazható, amelyeknél magas a kromoszómaszám és a kromoszómák mérete változékony. Elsősorban a *Saccharomyces*-eknél használatos. A kisebb kromoszómaszámú fajoknál nem szokás használni.

A két keresztirányú elektromos térerő váltakozó alkalmazása során a kromoszómák folyamatosan változtatni kényszerülnek vándorlásuk irányát. Ennek eredményeképpen a nagy DNS fragmentumok nem ragadnak meg az agaróz gélmátrixban hanem elválaszthatók lesznek. A sávok felbontását meghatározó paraméterek az elektromos mezők közötti váltási idők, az agaróz koncentrációja, a hőmérséklet és az elektromos mezők közötti szög. A módszer igen hatékony a *S. cerevisiae* törzsek megkülönböztetésére is a fajon belüli változatok közötti kromoszómaszám és -méret különbségek kimutatása által (Ryu és Mtsi.,1996; Giudici és Mtsi., 1998.)

Munkánk során a pontos fajmeghatározás mellett genotipizálni szeretnénk volna a törzseinket, hogy megkülönböztessük egymástól az általunk beoltott élesztő törzseket a jelenlévő többi vad törzsektől. Ehhez mi is a fentebb ismertetett módszerek közül a mitokondriális DNS restrikciós analízist, a RAPD-ot, a  $\delta$  szekvenciák amplifikációját és a kariotipizálást alkalmaztuk.

## 4. Anyag és módszer

### 4.1 Felhasznált élesztőtörzsek

A felhasznált törzseket az 1. 2. és a 3. táblázat tartalmazza. Az 1. táblázatban azok a törzsek szerepelnek, melyeket Soós és Ásvány (1950) izoláltak. Ezekre a törzsekre a dolgozatban az eredeti elnevezésükre utalva Tokaj-törzsekként fogunk hivatkozni. A 2. táblázatban a multistarterkultúra fejlesztéshez felhasznált törzseket soroljuk fel. A 3. táblázatban a kontroll törzseket szerepeltetjük. A törzseket YPGA (2% w/v glükóz, 2% w/v agar, 1% w/v élesztő kivonat és 1% w/v pepton;) táptalajon voltak fenttartva.

1. táblázat: A felhasznált élesztőtörzsek a Tokaj-törzsek vizsgálatához

Azonosító	Elnevezés <sup>a</sup>	NCAIM <sup>b</sup> azonosító	Izolálás forrása	Izolálás helye és ideje	Fajnév <sup>a</sup>
10-1343	Tokaj1	Y.00240	fiatal bor (furmint)	Mád, 1901	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>
10-1344	Tokaj2	Y.00252	furmint üledék	Tarcal, 1901	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>
10-1345	Tokaj4	Y.00303	fiatal bor (furmint)	Tarcal, 1905	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>
10-1346	Tokaj5	Y.00302	fiatal bor (furmint)	Mád, 1905	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>
10-1347	Tokaj7	Y.00203	fiatal bor (furmint)	Tarcal, 1905	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>
10-1348	Tokaj8	Y.00366	bor üledék (furmint)	Mád, 1903	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>
10-1349	Tokaj9	Y.00225	bor üledék (furmint)	Mád, 1901	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>
10-1350	Tokaj10	Y.00250	fiatal bor (furmint)	Tarcal, 1901	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>
10-1351	Tokaj11	Y.00233	bor üledék (furmint)	Tarcal, 1901	<i>S. cerevisiae</i> <i>var. ellipsoidens</i>

Azonosító	Elnevezés <sup>a</sup>	NCAIM <sup>b</sup> azonosító	Izolálás forrása	Izolálás helye és ideje	Fajnév <sup>a</sup>
10-1352	Tokaj12	Y.00261	fiatal bor (furmint)	Mád, 1902	<i>S. cerevisiae</i> <i>var.ellipsoidens</i>
10-1353	Tokaj13	Y.00254	furmint üledék	Tarcal, 1901	<i>S. cerevisiae</i> <i>var.ellipsoidens</i>
10-1354	Tokaj15	Y.00248	furmint üledék	Mád, 1904	<i>S. cerevisiae</i> <i>var.ellipsoidens</i>
10-1355	Tokaj18	Y.00368	bor üledék (furmint)	Tolcsva, 1901	<i>S. cerevisiae</i> <i>var.ellipsoidens</i>
10-1356	Tokaj19	Y.00369	öt éves aszú (furmint)	Mád, 1906	<i>S. cerevisiae</i> <i>var.ellipsoidens</i>
10-1357	Tokaj21	Y.00236	fiatal sárga muskotály	Tarcal, 1901	<i>S. cerevisiae</i> <i>var.ellipsoidens</i>
10-1358	Tokaj22	Y.00207	fiatal furmint	Olaszliszka, 1903	<i>S. cerevisiae</i> <i>var.ellipsoidens</i>

a: Soós és Asvány 1950; b:National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Hungary;

2. Táblázat: A multistarterkultúra fejlesztéshez felhasznált törzseket

Azonosító	Egyéb elnevezés	Izolálás forrása	Izolálás helye és ideje	Fajnév
10-403	T1/2	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. cerevisiae</i>
10-489	B2/26	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. cerevisiae</i>
10-492	B4/7	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. cerevisiae</i>
10-493	B4/11	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. cerevisiae</i>

Azonosító	Egyéb elnevezés	Izolálás forrása	Izolálás helye és ideje	Fajnév
10-496	B4/15	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. cerevisiae</i>
10-483	B2/4	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-484	B2/14	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-485	B2/15	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
0-486	B2/22	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-488	B2/25	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-491	B4/3	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-499	B6/1	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-501	B6/23	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-503	B9/2	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-505	B10/38	botritizált must	Bodrogkeresztúr, 2000 <sup>c</sup>	<i>S. uvarum</i>
10-373	NCAIM Y016668	botritizált must	Tolcsva, 2001 <sup>a</sup>	<i>C. zemplinina</i>
10-375	NCAIM Y016670	botritizált must	Tolcsva, 2001 <sup>a</sup>	<i>C. zemplinina</i>
10-372	Y.01667 T	botritizált must	Tolcsva, 2001 <sup>a</sup>	<i>C. zemplinina</i>
10-374	Y.01669	botritizált must	Tolcsva, 2001 <sup>a</sup>	<i>C. zemplinina</i>
10-5.11		botritizált szőlő	Tarcal, 2003 <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-152	II.SE 12	botritizált szőlő	Tarcal, 2003, <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
10-376	Aszú2 1/16	botritizált must	Tolcsva	<i>C. zemplinina</i>

Azonosító	Egyéb elnevezés	Izolálás forrása	Izolálás helye és ideje	Fajnév
10-377		botritizált must	Tolcsva	<i>C. zemplinina</i>
10-622		szőlő	Spanyolország	<i>C. zemplinina</i>
10-624		szőlő	Spanyolország	<i>C. zemplinina</i>
11-1	CECT11 969	szőlő must	Almeria, Spanyolország <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-4	RIVE 3.16.2	Kaptan-nal kezelt szőlő	Szlovákia <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-6	CBS1713	erjedő must	Verona, Olaszország <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-8	CBS2649	erjedő must	Franciaország <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-9	CBS2779	talaj	Dél- Afrika <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-10	CBS6100	ismeretlen	ismeretlen <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-18	FAW3; Stasa8	erjedő bor	Waedenswill, Svájc <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-19	Rbst 9- 00; Stasa444	erjedő bor	Waedenswill, Svájc <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
10-376	Aszú2 1/16	botritizált must	Tolcsva	<i>C. zemplinina</i>
11-20	Rst98/10/ 7; Stasa214	erjedő bor	Waedenswill, Svájc <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-31.	KE402.8 6.02.19		Budapest	<i>C. zemplinina</i>
11-60	CBS4729	<i>Drosophila</i>	USA <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-75	CBS6101		ismeretlen <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-88	I/3 T1.3.29	botritizált szőlő	Tarcal <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-101	I/7 16.4.20	botritizált szőlő	Tarcal <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-4	RIVE 3.16.2	Kaptan-nal kezelt szőlő	Szlovákia <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>

Azonosító	Egyéb elnevezés	Izolálás forrása	Izolálás helye és ideje	Fajnév
11-107	II/4 10.5.11	botritizált szőlő	Tarcal <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-124	I/3 T2.3.1	botritizált szőlő	Tarcal <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-128	I/2 5.3.52	botritizált szőlő	Tarcal <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-135	I/8 25.1.1	botritizált szőlő	Tarcal <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-138	I/8 26.1.35	botritizált szőlő	Tarcal <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-144	I. VME. 4	aszú esszencia	Erdőbénye <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-148	OE12	aszú esszencia	Tolcsva <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-149	I.DE.1	aszú esszencia	Tarcal <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-150	I.SE.1	aszú esszencia	Tarcal	<i>C. zemplinina</i>
11-159	II.LA6	aszú esszencia	Erdőbénye <sup>b</sup>	<i>C. zemplinina</i>
11-479		rothadó banán	Fülöp szigetek, Manila	<i>C. zemplinina</i>
11-659	IV.BK21	erjedő must	Badacsony	<i>C. zemplinina</i>

a: Sipiczki M. (2003).; b: Csoma, H. és Sipiczki, M. (2008).; c: Naumov és Mtsi., (2002).

NCYC: National Collection of Yeast Cultures, United Kingdom; NCAIM: National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Hungary; CECT: Spanish Type Culture Collection, Spain; CBS: Westerdijk Fungal Biodiversity Institute Collection, Netherlands .

3. Táblázat: A felhasznált kontroll törzsek

<b>Azonosító</b>	<b>Egyéb elnevezés</b>	<b>Tulajdonság</b>	<b>Fajnév</b>
11-182	NCYC 738	K2 killer	<i>S. cerevisiae</i>
11-183	NCYC 232	K1 killer	<i>S. cerevisiae</i>
11-184	NCYC 1006	Szenzitív	<i>S. cerevisiae</i>
10-642	S288C *		<i>S. cerevisiae</i>
	Lallemand Uvaferm 43	Kereskedelmi starterkultúra	<i>S. cerevisiae</i>
	Ever Mycoferm CRU 31	Kereskedelmi starterkultúra	<i>S. cerevisiae</i>

\*:Mortimer és Johnston, 1986

## 4.2 Táptalajok

A munkánk során felhasznált táptalajokat Sipiczki és Ferenczy (1977), Kreger van-Rij (1984) és Barnett és Mtsi., (1990) szerint készítettük el és azok összetételét a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: Munkánk során felhasznált táptalajok összetétele.

YPGL	100 ml desztillált vízben, pH: 5,0 1,0 g élesztőkivonat 1,0 g pepton 2,0 g glükóz	SML	100 ml desztillált vízben 0,5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7,4 mM) 0,05 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1,0 g glükóz 100 µl Wickerham vitamin-oldat
YPGA	100 ml YEPL 2,0 g por agar	SMA	100 ml SML 2,0 g por agar
Spóráztató K-acetátos táptalaj	1000 ml desztillált vízben 10,0 g kálium-acetát 1,0 g élesztő kivonat 0,5 g glükóz 20,0 g agar	Krétás agar	1000 ml ösztérfogó 750 ml deszt.víz pH:5,0 5,0 g élesztő kivonat 50,0 g glükóz 25,0 g agar Külön elkészítve 250 ml 1% w/v -os CaCO <sub>3</sub> -oldat
Biggy	1000 ml desztillált vízben bizmut- ammónium-citrát 5,0 g nátrium- szulfít 3,0 g glükóz 10,0 g glycin 10,0 g élesztő kivonat 1,0 g bakterológiai agar 16,0 g pH: 6.8	Wickerham vitamin-oldat	100 ml desztillált vízben 0,2 mg folsav 0,2 mg biotin 40 mg Ca-pantotenát 200 mg inozitol 40 mg niacin 20 mg p-amino-benzoésav 40 mg piridoxin. HCl 40 mg aneurin. HCl /tiamin/ 20 mg riboflavin

MMM tápfolyadék	
A oldat:	
375 ml desztillált vízben:	100,0 g glükóz 100,0 g fruktóz 4,0 ml „ergo stock”
Ergo stock:	12,5 ml Tween 80 37,5 ml 95% (v/v) etanol 0,125 g ergoszterol
500 ml-re kiegészíteni desztillált vízzel	
B oldat:	
250 ml desztillált vízben:	6,0 g L+borkősav 3,0 g L-almasav 0,5 g citromsav
C oldat:	
250 ml desztillált vízben:	1,7 g YNB (difco) élesztő nitrogénbázis ammónium-szulfát aminosavak nélkül 2,0 g kazamino sav 6,0 mg myoinozitol 0,2 g CaCl <sub>2</sub> 0,8 g L- arginin 1,0 g L- prolin 0,1 g triptofán 1,0 g ammónium foszfát
A, B és C oldat összekeverve pH: 3,25	

### 4.3 Reagensek és oldatok

Munkánk során felhasznált reagensek és oldatok összetételét az 5. táblázat tartalmazza.

Rövidítések: EDTA: Etilén-diamin-tetraecetsav

Tris: Trisz(hidroximetil)-aminometán

5. táblázat: Munkánk során felhasznált reagensek és oldatok összetétele.

Oldatok a genomi DNS izolálásához (Millipore víz)	
Lízis puffer (100 ml)	0,5 ml 2M Tris-HCl pH: 8.0 0,2 ml 0,5M EDTA (Sigma E5134) pH: 8.0 2,0 ml 5M NaCl 2,0 ml Triton X 1,0 g SDS
1xTE (100 ml) pH: 8.0	1,0 ml 1M tris-HCl 2,0 ml 0,5M EDTA
RNáz A törzsoldat 10 mg/ml (1 ml)	10,0 mg Ribonukleáz A (Sigma R 5000) 1,0 ml 1xTE

Oldatok az agaróz gélelektroforézishez	
0,5 M EDTA (1000 ml) pH: 8.0	25,5 g EDTA (Sigma E5134) 186,1 g NaOH
1 M TRIS (1000 ml) pH: 8.0	121,4 g Tris (Sigma T6066)
10xTBE (1000 ml) pH: 8.0	109,0 g Tris (Sigma T6066) 55,6 g bórsav 40,0 ml 0,5M EDTA (Sigma E5134)
1xTBE (1000 ml) pH: 8.0	100,0 ml 10xTBE
etidium-bromid 10 mg/ml törzsoldat (10 ml)	100,0 mg etidium-bromid

CHEF oldatok (kariotipizáláshoz)	
Lízis puffer (CHEF) (100 ml)	1,0 ml 1 M Tris (Sigma T6066) 90,0 ml 0,5 M EDTA (Sigma E5134) 10,0 ml 10% (v/v) Na-Lauril-Szarkozin
CPE (100 ml)	4,0 ml 1 M citromsav 60,0 ml 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,0 ml 0,5 M EDTA (Sigma E5134)
CPES (100 ml)	4,0 ml 1 M citromsav 60,0 ml 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,0 ml 0,5 M EDTA (Sigma E5134) 21,84 g szorbitol
Proteináz K törzsoldat 20 mg/ml (1 ml)	20,0 mg Proteinase K
A puffer (100 ml) pH: 7,5	9,1 g szorbitol 2 ml 0,5 M EDTA (Sigma E5134) 5ml 1 M Tris (Sigma T6066)
B puffer (100 ml)	0,5844 g NaCl 2,0 ml 0,5 M EDTA (Sigma E5134) 5,0 ml 1 M Tris (Sigma T6066) 10,0 ml 10% (v/v) Na-Lauril-Szarkozin
0,65 M-os KCl oldat	1000 ml millipore vízben 48,45g KCl
5 M-os K-acetát oldat	1000 ml millipore vízben 490,7 g K-acetát
3 M-os Na-acetát oldat	1000 ml millipore vízben 246,0 g Na-acetát
Zymolyase 20T törzsoldat 10 mg/ml (1 ml)	10 mg Zymolyase 20T (ICN 320921)
10% w/v-os SDS	100,0 ml Millipore vízben 10,0 g Na-dodecil-szulfát

Borászati analitikai vizsgálatok oldatai	
0,1 M NaOH oldat (1000 ml)	4,0 g NaOH
1 M NaOH oldat (1000 ml)	40,0 g NaOH
1/64 n K(HIO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> oldat (1000 ml)	0,5076 g K(HIO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
16-17 v/v%-os H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> oldat	830,0 ml desztillált víz 80,0 ml cc H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Keményítő (1000 ml)	20,0 g keményítő 20,0 g KI
CuSO <sub>4</sub> oldat (1000 ml)	41,92 g CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O 10,0 ml cc H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Seignette só oldat (1000 ml)	250,0 g K-Na-tartarát 80,0 g NaOH
30 % w/v KI (1000 ml)	300,0 g Kálium-jodid 100,0 ml 1 M NaOH
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> oldat (1000 ml)	9,05 g vízmentes Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 2,0 g NaOH
Fenolftalein indikátor (100 ml)	1,0 g fenolftaleint 60,0 ml 96 %-os alkohol
20 % w/v borkősav oldat (100 ml)	20,0 g borkősav

#### 4.4 Makro- és mikromorfológiai vizsgálatok

A makromorfológiai vizsgálatok során megfigyeltük a vizsgált élesztőtelepek formáját, nagyságát, színét, állagát, felszínét, szerkezetét és körvonalát. A vizsgálathoz a törzsekből egy kacsnyit oltottunk le YPGA táplémez közepére és 25°C-on inkubáltuk 30 napig.

A mikromorfológiai vizsgálathoz egyéjszakás YPGL-ben növesztett sejteket használtunk. Az élesztősejtek méretét, alakját, sarjképzését natív mintán

figyeltük meg fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálattal 400X nagyításon. Ezekhez a vizsgálatokhoz YEPA táptalajon növesztett 3 napos tenyészeteket, illetve az óriástelepek megfigyeléséhez 1 hónapos leoltásokat használtunk. Az inkubálás 25°C-on történt.

#### 4.5 Növekedési és asszimilációs vizsgálatok

A konvencionális élesztőfaj-meghatározási módszereket Kreger van-Rij és Barnett leírásai alapján végeztük el (Kreger van-Rij 1984, Barnett és Mtsi., 1990). Az élesztőtörzsek fajra jellemző, specifikus enzimrendszereikkel különböző szénforrásokat képesek metabolizálni az energia szükségletük fedezéséhez. Az asszimilációs vizsgálatok által megállapíthatjuk, hogy az izolált, különböző élesztőtörzsek anyagcsere folyamataik során milyen szén- és nitrogénforrást képesek felhasználni. Vizsgálataink során szénforrásként glükózt, galaktózt, maltózt, cellobiózt, raffinózt, mannitot és glicerint, nitrogénforrásként lizint, illetve nitrátot tartalmazó minimál (SMA), valamint vitaminmentes minimál táptalajokat alkalmaztunk. A vizsgált telepeket steril bársony segítségével, replikázás módszerével vittük fel a különböző szén- és nitrogénforrást tartalmazó minimál táptalajainkra. Fontos taxonómiai bélyeg a törzsek 37°C-on való növekedése, melyet komplett táptalajon (YEPA) vizsgáltunk. Az SMA táptalajokat 25°C-on inkubáltuk és öt nap után olvastuk le a csészéket.

A vizsgálathoz kiválasztott szubsztrátokkal faj szintű elkülönítést tudtunk végezni, illetve az általunk beoltott starterkulturaként használt törzsek asszimilációs képességeivel összevetve a többi törzs eredményét ki lehet alakítani egy „starterkultúra gyanús” csoportot az

izolátumok között. Ezekből a csoportokból kerültek ki azok a reprezentatív izolátumok, melyekkel a molekuláris ujjlenyomat technikákat elvégeztük.

#### 4.6 A törzsek molekuláris taxonómiai meghatározása

##### 4.6.1 Genomiális DNS izolálása

A genomi DNS izolálásához 24 órás folyékony tenyészetet készítettünk a törzsekből YPL tápfolyadékban. A Genomi DNS izolálása Hanna és Xiao (2006) szerint történt.

50 ml 25 °C-on inkubált előtenyészetet centrifugáltunk (4000 rpm, 5 perc, 4°C, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ ) ezután, mostuk 1 ml millipore vízzel, majd átpipettáztuk 2 ml-es eppendorf csövekbe. Ezt újabb centrifugálás követte (4000 rpm, 5 perc, 4°C, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ ), hozzáadtunk 0,2 ml lízis puffert, 0,2 ml fenol-kloroformot és 0,3 g üveggyöngyöt. A sejteket 5 percig vortexeltük, majd 0,2 ml 1×TE oldatot adtunk hozzá. A következő lépésben centrifugálás után (4000 rpm, 5 perc, 4°C, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ ) új eppendorf csövekbe pipettáztuk a felülúszót és 2 ml abszolút etanollal elvégeztük a kicsapást.

A precipitátum kiülepítésért centrifugáltuk a csöveket (13000 rpm, 10 perc, 4°C, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ ). A felülúszót óvatosan leszívtuk. A pelletet 70v/v%-os etanollal mostuk, centrifugáltuk (13000 rpm, 3 perc, 4°C, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ ) majd a felülúszót óvatosan leszívtuk és szárítottuk a pelletet. Száradás után a kapott nukleinsavat 1×TE-ben felvettük és RNázal kezeltük 37°C-on 30 percig. 1% w/v-os agaróz gélben (hozzáadva 5µl etidium-bromid 10 mg/ml törzsoldatból), 1×TBE pufferben 120 V-on futattuk 5 µl DNS minta, 12 µl desztillált víz és 3 µl „loading” puffer elegyét.

#### 4.6.2 Az rRNS-eket kódoló szakaszok amplifikálása polimeráz láncreakcióval és a szekvencia analízise

A pontos molekuláris taxonómiai meghatározáshoz két konzervatív régiókat, az ITS1-5.8S rRNS-ITS4 és a 26S rRNS nagy alegység (LSU) D1/D2 doménjét kódoló régiókat a szekvencia analízisét használtuk fel.

A vizsgálatok során az ITS1-5.8S rRNS-ITS2 régiót az alábbi primereket felhasználva szaporítottuk fel (White és Mtsi., 1990):

ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3')

ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3').

Az rRNS 26S nagy alegységének D1/D2 doménjét az NL-1 és NL-4 primerekkel szaporítottuk fel (O'Donnell, 1993).

NL1 (5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3')

NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3')

Az amplifikációhoz a következő PCR reakció elegyet mértük össze:

34,5 µl Millipore víz

10 µl PCR puffer MgCl<sub>2</sub>-dal 10x (Thermo Fisher Scientific B34)

2 µl dNTP mix (10mM) (Thermo Fisher Scientific 18427089)

0,5-0,5 µl forward és reverse primer (100 µM)

0,5 µl Dream Taq Polymerase enzim (5 u/µl) (Thermo Fisher Scientific EP0701)

A reakció elegyhez 2 µl (1-4 ng/µl) genomiális DNS-t adtunk.

A gélelektroforézis során 3 µl PCR terméket 100 ml 1v/v%-os 5 µl (5 µg/ml) hozzáadott ethidium-bromidot tartalmazó agaróz gélben 120V-on, 1x TBE pufferben futtattuk. A termékek vizualizációhoz UV transilluminátort

használtunk (MiniBIS Pro transzilluminátor, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., GelCapture version 5.8 szoftverrel). Méret sztenderdként 1 kb DNS létrát használtunk (Thermo Scientific SM0243).

Az Applied Biosystems 2720 készülékét használtuk a célszekvenciák felsokszorosításához.

A PCR programunk az alábbi ciklusokból állt:

ITS1-5,8S-ITS2 PCR: 94 °C 2 perc, 25x: 95 °C 1 perc, 60 °C 1 perc, 75 °C 1 perc és 72 °C 15 perc.

D1/D2 PCR: 94 °C 2 perc, 35x: 94 °C 1 perc, 51 °C 1 perc, 72 °C 2,5 perc és 72 °C 15 perc.

A kapott PCR termékek koncentrációját mikrotérfogat fotométerrel (NanoDrop Thermo Fischer) meghatároztuk, majd 15 ng/μl koncentrációra kihígítottuk. A mintát a Microsynth cég bécsi laboratóriumába küldtük szekvenálásra. A szekvenálást minden esetben mindkét irányból elvégeztettük. A kapott szekvencia párokat illesztettük és ha valahol bizonytalan nukleotidot találtunk az egyik szekvenciában, de a vele szemben lévő nukleotid beazonosítható volt, akkor az alapján hoztuk létre a konszenzus szekvenciát, amit a további elemzéshez használtunk fel.

A szekvenciák taxonómiai hovatartozásának vizsgálata érdekében először általános hasonlóságkeresést végeztünk az NCBI GenBank adatbázisában a hozzá kapcsolt BLAST szolgáltatás segítségével. A leghasonlóbb találatok alapján valószínűsíthető volt, hogy melyik fajhoz tartozhatott a szekvencia. Ennek egyértelművé tétele érdekében a szekvenciát

összehasonlítottuk a faj típusörzsének szekvenciájával, amit a CBS adatbázisból töltöttünk le (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database>).

#### 4.6.3 PCR-ujjlenyomat módszerek

Az alábbi RAPD és mikroszatellit primereket használtuk: primer 24 (5'-GCG TGA CTT G-3') (Baleiras Couto Mtsi., 1996), primer RF2 (5'-CGG CCC CTG T-3') (Paffetti és Mtsi., 1995), és (GTG)<sub>5</sub> (Lieckfeldt és Mtsi., 1993), 1283 (5'-GCG ATC CCC A-3') (Akopyanz et al., 1992).

Az interdelta genotipizálást ( $\delta$ -PCR) Legras és Karst (2003) protokollja szerint végeztük el az alábbi primerekkel:

delta1 (5'-CAAAATTCACCTATWCTCA-3'),  
delta2 (5'-GTGGATTTTTATTCCAACA-3') és  
delta12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3').

$\delta$ -PCR reakciókat az alábbi két kombinációban végeztük el: delta1-2 és delta 12-2, Pfliegler és Mtsi 2014 szerint.

A PCR fingerprinting reakciójához szükséges genomi DNS koncentrációját UVS-99 Micro-Volume UV/Vis Spektrofotométeren (ATCGene) mértük le és 100 ng/ $\mu$ l koncentrációra állítottuk be. Minden egyes reakcióhoz 50 ng-t használtunk fel. PCR reakciók az alábbi program szerint készültek el: 94 °C, 5 perc, 30x (94 °C 50 másodperc, T<sub>m</sub> 50 másodperc, 72 °C 50 másodperc), 72 °C 5 perc. A T<sub>m</sub> RF2 primer esetében 36 °C-ra, RAPD24 primer esetében 38 °C-ra RAPD1283 primer esetében 36°C-ra, (GTG)<sub>5</sub> esetében 50 °C-ra és a  $\delta$ -PCR esetében 55 °C-ra volt

beállítva (Akopyanz et al., 1992; Legras and Karst 2003; Pfliegler és Sipiczki. 2016). Az amplifikációhoz, a GoTaq® DNA polimerázból (Promega) 1,5 egységet használtunk GoTaq Green pufferrel (Promega) kiegészítve MgCl<sub>2</sub>-vel (Thermo Scientific) 2,5 mM vég koncentrációval és 1 µg BSA-val (Biolabs). A primereket 25 pmol-os koncentrációban használtuk. Az ujjlenyomat PCR reakciókat 25 µl végtérfogattal állítottuk össze és az Applied Biosystems 2720 készülékét használtuk a felszaporításhoz.

A PCR termékeket 1.4% w/v (RAPD24, RF2, RAPD1283 (GTG)<sub>5</sub>) és 2% w/v (δ-PCR) agaróz gélben választottuk el, a festést ethidium-bromiddal végeztük. Az elektroforézist az alábbi beállításokkal végeztük: 90V, 75 percig 1xTBE pufferben, a vizualizációhoz UV transzilluminátort használtunk (MiniBIS Pro transzilluminátor, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., GelCapture version 5.8 szoftverrel). Az 1 Kb és ΦX174 DNA/ Hinfl DNS létrát használtuk méret sztenderdként (Thermo Scientific).

A sávmintázatokból bináris mátrixot hoztunk létre, amiből távolságmátrixot számoltunk a Dice koefficiens alapján, majd az UPGMA algoritmussal dendrogrammot készítettünk a <http://genomes.urv.es/UPGMA/> szolgáltatás (Garcia-Vallvé és Mtsi., 1999) felhasználásával. A dendrogram elkészítéséhez a FigTree v1.4.2. szoftvert alkalmaztuk. A két interdelta és a három RAPD/mikroszatellita analízis eredményeit kombináltuk, hogy két még részletesebb dendrogramot kapjunk. Abban az esetben végeztünk biológiai ismétlést, ha valamilyen technikai okból kifolyólag nem kaptunk mintázatot.

#### 4.6.4 Elektroforetikus kariotipizálás

A kromoszómális DNS-t agaróz blokkokba ágyasztuk Karanyicz és Mtsi., 2017 protokollja alapján. Egyéjszakás (25 °C) YPL tápfolyadékban felszaporított sejtenyészetet használtunk fel, melynek a koncentrációját  $1,3-1,5 \times 10^9$  sejt/ml-re állítottuk be. A sejteket centrifugáltuk 4000 rpm-en 5 percig, 4°C-on. A kiülepedett sejteket 2ml, 50 mM EDTA oldattal mostuk, majd centrifugáltuk 4000 rpm-en 5 percig, 4°C-on. A sejteket 500 µl 250 µg/ml Zymolyase 20T enzimet és 5 mM DTT-t tartalmazó CPES pufferben felszuszpendáltuk. Az alacsony olvadáspontú agarózt felforraltuk, majd 50 °C-os szárazblokkba tettük. 500 µl 50 °C-os 2% w/v-os alacsony olvadáspontú agarózt kevertünk a sejtuszpenzióhoz, majd 200 µl térfogatú formákba pipettáztuk azt. Az agaróz megszilárdulásához hűtőszekrénybe, 4 °C-ra helyeztük a mintákat 10 percre. Az agaróz blokkokba ágyazott mintákat 1,5 ml CPE pufferbe helyeztük és 37 °C-os szárazblokkban inkubáltuk két órán át, mialatt protoplasztálódtak a sejtek. A mintákról a CPE puffert leszívtuk és rámértünk 1,5 ml, 0,5 mg/ml Proteinase K enzimet tartalmazó lízis puffert. 50 °C-on inkubáltuk a mintákat egy éjszakán át. A lízis puffert eltávolítottuk és 1,5 ml, 1x TE oldattal háromszor mostuk a mintákat. A mosások között az agaróz blokkokat 50 °C-on 20 percig inkubáltuk.

A beágyazott mintákból kiszabadítható kromoszómaméretű DNS molekulákat 1% w/v-os agaróz gélben (Chromosomal grade, BioRad, Hercules, CA) 0,5x TBE pufferben a CHEF-Mapper (Bio-Rad) készülékkel végzett pulzáló erőterű elektroforézissel méret szerint szétválasztottuk. A futási paraméterek az alábbiak voltak: 200V, 6 V/cm, 14 °C, linear ramping 60-tól 120 s -ig 24 óráig.

Az elválasztást követően a gélt 5 µg/ml ethidium-bromidot tartalmazó Millipore vízben 10 percig festettük. Festés után a gélt ázni hagyjuk desztillált vízben, 4 °C-on egy éjszakán keresztül. Vizsgáltuk a kromoszómákat képviselő sávok számát és méretét (a törzs kariotípusát). A kromoszómális sáv mintázatot UV-transzilluminátoron fényképeztük. A törzsek kariotípusait UPGMA analízissel hasonlítottuk össze az előző fejezetben leírtak szerint.

#### 4.6.5 Mitokondriális DNS (mtDNS) kivonása és restriktációs analízise.

A mtDNS-t exponenciális fázisban levő tenyészetből vontuk ki Defontaine és Mtsi. (1991) protokollja alapján.

50 ml YPL-ben felszaporított, exponenciális fázisú sejtenyészetből indultunk ki. A sejteket centrifugáltuk 4000 rpm-mel, 5 percig, 4°C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A felülúszót óvatosan leöntöttük és 4 ml steril desztillált vízzel mostuk a sejteket majd centrifugáltuk 4000 rpm-mel, 5 percig, 4°C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A felülúszót leöntöttük és 4 ml, 50 mM-os, hideg EDTA-val mostuk a sejteket, majd centrifugáltuk 4000 rpm-mel, 5 percig, 4°C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A felülúszót eltávolítottuk és az üledéket felszuszpendáltuk 10 ml 1,2 M szorbitolt, 50 mM EDTA-t és 2 v/v% merkaptóetanolt tartalmazó oldatban. 37 °C-on inkubáltuk 10 percig. A mintákat 4000 rpm-mel 5 percig centrifugáltuk, 4°C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A felülúszó leöntése után 5 ml „A” pufferben felszuszpendáltuk a sejteket.

A protoplasztáláshoz 0,7 ml merkaptóetanolt és 10 mg Zymolyase 20T enzimet hozzáadtunk az elegyhez. 37 °C-on 60 percig inkubáltuk a sejteket, miközben időnként átforgattuk a mintákat. A protoplasztok feltárását

szonikátorral végeztük az alábbiak szerint: a mintákat jégben hűtve 19,3-19,5 KHz-en 7 másodpercig kezeltük majd 23 másodpercig pihentettük a felmelegedés elkerülése végett, ezt 2 percen keresztül folytattuk. Ezután lecentrifugáltuk a sejteket 2800 rpm-mel 10 percig , 4°C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A felülúszót átpipettáztuk új 2 ml-es eppendorf csövekbe, majd centrifugáltuk, 13000 rpm-mel 10 percig , 4°C-on. A felülúszót leszívtuk és a pelletet 3-szor mostuk 0,5 ml „A” pufferrel, közben centrifugáltuk 13000 rpm-mel 5 percig , 4°C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A követő lépésben a sejteket 0,5ml „A” pufferben felfuszpendáltuk és 2 $\mu\text{l}$  DNáz-val és 2 $\mu\text{l}$  25 mM  $\text{MgCl}_2$ -val kezeltük 10 percig szobahőn, miközben néha megkevertük. Hozzáadtunk még 1ml „A” puffert és 13000 rpm-mel, 10 percig centrifugáltuk , 4°C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A felülúszót leszívtuk és az üledéket 0,5 ml „B” pufferben felvettük, majd 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, időnként átforgattuk. 0,5 ml Fenol:Kloroform:Izoamil alkoholt pipettáztunk az elegyhez majd 13000 rpm-mel 10 percig centrifugáltuk , 4°C-on, 4 °C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A felső vizes fázist átpipettáztuk egy új Eppendorf csőbe, amihez 40  $\mu\text{l}$  Na-acetátot és 400  $\mu\text{l}$  izopropanolt adtunk. Az elegyet óvatosan összekevertük majd centrifugáltuk 13000 rpm-mel, 10 percig , 4°C-on, 4 °C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . A felülúszót eltávolítottuk és 70 v/v%-os etanollal mostuk a pelletet, majd centrifugáltuk 13000 rpm-mel, 5 percig , 4°C-on, 4 °C-on, rotor  $r_{\max}=95\text{mm}$ . Ezt követően a mintákat megszáritottuk, és felvettük 30  $\mu\text{l}$  1x TE-ben majd 2  $\mu\text{l}$  RNáz A oldatot (10 mg/ml) adtunk hozzá. 37 °C-on 30 percig inkubáltuk a mintákat. 20  $\mu\text{l}$  mtDNS-t emésztettük *EcoRV*(Thermo Scientific) restrikciós endonukleázal., A kapott fragmenseket 0,7% w/v-os agarózgélben 0,5x TBE-ben választottuk el, majd transziluminátorban vizualizáltuk.

## 4.7 A törzsek fiziológiai vizsgálata

### 4.7.1 Sporulációs képesség meghatározása

A sporulációt spóráztató K-acetát-os táptalajon indukáltuk. YPGA komplett táptalajon növesztett telepekből egy kacsnyit oltottunk át a spóráztató táptalajra. A csészéket 25 °C-os termosztátban inkubáltuk 30 napig, majd fáziskontraszt mikroszkópban 400X nagyításon megfigyeltük a spórázási képességüket.

### 4.7.2 A törzsek kénhidrogéntermelő képessége

A kénhidrogéntermelő képességet két különböző módszerrel határoztuk meg.

A kénhidrogén termelés meghatározása Nickerson (BiGGY) agar-on (DIFCO) történt Nickerson WJ. 1953 cikke alapján. A csészéket 25 °C-on, inkubáltuk és 5 nap múlva értékeltük. Az élesztő telepek elszíneződésének mértéke arányos a termelt kénhidrogén mennyiségével.

1= fehér, 2 = krém, 3 = világos barna, 4 = barna, 5 = sötét barna, 6= fekete. (Sipiczki és Mtsi., 2001).

A *C. zemplinina* törzsek vizsgálatához a Nickerson (BiGGY) agart úgy módosítottuk, hogy elősegítsük a törzsek gyors növekedését: a glicin, a nátrium-szulfít és a bizmut-ammónium-citrát mennyiségét a felére csökkentettük Nickersonhoz képest (1953) előzetes kísérletekre alapozva.

A törzsek kénhidrogén termelő képességét Linderholm (Linderholm és Mtsi, 2008) módszere alapján is meghatároztuk fermentációs körülmények között. A módszer lényege, hogy a termelt illékony hidrogén szulfid az

ólomacetát mátrixban lévő ólommal kölcsönhatásba lépve sötét csapadékot képez. A fermentációt 50ml MMM tápfolyadékban kiviteleztük, melyet  $1,0 \times 10^5$  sejt/ml koncentrációjú MMM tápfolyadékban növesztett 24 órás előtenyésztéssel oltottunk be. A lombikok gőzterébe ólom-acetát-os tesztcsíkot (Sigma-Aldrich 06728) lógattunk, melynek elszíneződését 5 nap 25°C-os inkubálás után olvastuk le.

#### 4.7.3 A törzsek savtermelő képessége

A törzsek savtermelési képességét Custer féle krétás agaron vizsgáltuk meg (Belarbi és Lemaesquier, 1994). YPL tápfolyadékban növesztett sejtszuszpenzióból  $1,0 \times 10^5$  sejt/ml koncentrációjú 10  $\mu$ l szuszpenziót cseppentettünk ki a krétás agarra. A csészéket 25 °C-on, inkubáltuk. 5 nap és 30 nap múlva mértük a savtermelés esetében képződött feloldási zónát.

Illetve a törzsek egyéjszakás tenyésztéssel beoltott YPL tápfolyadék fermentlevének sav-bázis titrálásával meghatároztuk az összes titrálható sav tartalmát.

Az ecetsav és almasav termelést a törzsek egyéjszakás tenyésztéssel beoltott YPL tápfolyadék fermentlevének analitikai mérésével TDI MiuraOne automata bor analizátorral határoztuk meg.

#### 4.7.4 Killer aktivitás vizsgálata

A killer aktivitást Woods és Bevan (1968) publikációja szerint vizsgáltuk. A killer aktivitás vizsgálathoz 24 órás tenyészetet készítettünk, amiből 10  $\mu$ l-t sejtszuszpenziót csepegtettünk rá a 11-184 killer szenzitív

törzs pázsitjával szélesztett táptalajra. A törzsek szenzitív tulajdonságát a *S. cerevisiae* K1-típusú killer 11-183 és a K2-típusú killer 11-182 törzsekkel vizsgáltuk. Mindkét killer tulajdonságú törzs szuszpenziójából 10 $\mu$ l-t csepegtettünk a saját izolátumainkkal pázsitot szélesztett táptalajokra. A vizsgálathoz YPGA táptalajt használtunk, amit 0.003 g/l metilénkéssel egészítettünk ki. Killer pozitív aktivitás esetén egy gátló zóna alakul ki és az elhalt sejtek kékre színeződnek a zóna szélén.

#### 4.7.5 Ozmotikus tolerancia vizsgálata

Az ozmotikus körülmények törzsek növekedésére gyakorolt hatását 2, 20, 30, 40, 50 és 60% w/v glükóz tartalmú YPGA táptalajon és YPGL tápfolyadékban vizsgáltuk, melyeket 25 °C-on inkubáltuk 10 napig. Az agarlemezekeken végzett cseppesztekhez a törzsek YPGL-ben egy napig 25 °C-on növesztett, centrifugált tenyészetek pelletjét egyszer steril vízzel mostuk, majd steril vízben OD 0,1-es sejtszuszenziót készítettünk. A szuszpenziókból 10  $\mu$ l-t csepegtettünk a táptalajokra.

A tápfolyadékban a sejtszám gyarapodását a tenyészetek optikai denzitásának változásának mérésével vizsgáltuk 590 nm-en 48 óra múlva.

#### 4.7.6 Növekedési görbék felvétele optikai denzitás alapján

A törzsek egyéjszakás előtenyészetét különböző összetételű YPL tápfolyadékba leoltotunk 0,1 OD értékben, majd 12 °C és 22 °C-on rázatás nélkül inkubáltuk azokat. A törzsek szaporodását 590 nm-en fotometrálnya nyomon követtük a lag fázist 3 óránként, majd 24 óránként Amint az

abszorbancia meghaladta a 0,8 OD értéket, akkor a tenyészetet a küvetában tápfolyadékkal meghígítottuk a torzítás elkerülése végett.

#### 4.7.7 Erjesztési erély meghatározása a CO<sub>2</sub> elillanásából származó tömegveszteség mérése alapján

A próbaerjesztéshez 100 ml-es Erlenmeyer lombikokat használtunk, melyeket kotyogóval ellátott gumidugóval zártunk le. A kotyogón keresztül a termelődött CO<sub>2</sub> szababon eltávozik. A törzseket 50 ml módosított YPGL tápfolyadékba oltottuk 0,1 OD beállításával, majd 42 napon keresztül végeztük a fermentációs tesztet két hőmérsékleten (12 °C és 25 °C), rázatás nélkül. Az lombikok tömegét 72 óránként analitikai mérlegen megmértük. A tömegveszteség mértékéből következtetni tudunk az erjedés során keletkező CO<sub>2</sub> képződésének mértékére, így közvetve a törzsek erjesztési erejére és arra, hogy egyáltalán nem veszítették-e el az erjesztési képességüket.

#### 4.8 A *C. zemplinina* versenyképességének vizsgálata a kevert starterkultúrákban

A törzsekből egyéjszakás tenyészetet készítettünk YPGL tápfolyadékban. Másnap a tenyészetek sejtszámát  $1,0 \times 10^6$  sejt/ml-re kihígítottuk és a lentebbi arányokat a folyékony sejttenyészetek adott térfogatainak összekeverésével állítottuk be. A tenyészeteket 12 °C-on inkubáltuk, majd 9, 25, 49, 97, 145 és 245 óra múlva Bürker-kamrában számoltuk a különböző fajok sejtszámát. A fajok elkülönítését a sejtek mérete alapján végeztük. A vizsgálathoz módosított YPL tápfolyadékokat készítettünk, melyekben 20% w/v és 40% w/v glükóz tartalmat, valamint

8v/v% etanol végkoncentrációt állítottunk be. A *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzsek megkülönböztetéséhez szélesztettük a mintákat komplett YPGA táplemezre, majd random 100-100 telepet izoláltunk. Az izolátumokat 37 °C-os termosztátba tettük 3 napon keresztül. A *S. cerevisiae* képes ezen a hőmérsékleten növekedni, míg a *S. uvarum* nem, így megállapítottuk, hogy milyen arányban nőttek túl egymást a törzsek.

A kísérletekhez az alábbi törzseket használtuk fel:

*C. zemplinina*: 10-374; *S. cerevisiae*: 10-489; *S. uvarum*: 10-486

A kísérleti beállításokat a 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: *C. zemplinina* versenyképességének vizsgálata különböző arányban kevert starterkultúrákban és tápfolyadékokban

Sejtkoncentráció arányok	YPGL	YPGL+20% w/v glükóz	YPGL+40% w/v glükóz	YPGL+8% w/v etanol
1:1	1: C.z.-S.c. 2: C.z.-S.u.	15: C.z.-S.c. 17: C.z.-S.u.	16: C.z.-S.c. 18: C.z.-S.u.	35: C.z.-S.c. 36: C.z.-S.u.
1:1:1	3: C.z.-S.u.-S.c.			
1:2	4: C.z.-S.c. 5: C.z.-S.u.	19: C.z.-S.c. 21: C.z.-S.u.	20: C.z.-S.c. 22: C.z.-S.u.	37: C.z.-S.c. 38: C.z.-S.u.
2:1	6: C.z.-S.c. 7: C.z.-S.u.	23: C.z.-S.c. 25: C.z.-S.u.	24: C.z.-S.c. 26: C.z.-S.u.	39: C.z.-S.c. 40: C.z.-S.u.
2:1:1	8: C.z.-S.u.-S.c.			
1:2:2	9: C.z.-S.u.-S.c.			
1:4	10: C.z.-S.c. 11: C.z.-S.u.	27: C.z.-S.c. 29: C.z.-S.u.	28: C.z.-S.c. 30: C.z.-S.u.	41: C.z.-S.c. 42: C.z.-S.u.
4:1	12: C.z.-S.c. 13: C.z.-S.u.	31: C.z.-S.c. 33: C.z.-S.u.	32: C.z.-S.c. 34: C.z.-S.u.	43: C.z.-S.c. 44: C.z.-S.u.
4:1:1	14: C.z.-S.u.- S.c.			

## 4.9 Mikrovinifikációs kísérletek

### 4.9.1 Mikrovinifikáció a Soós és Ásvány által izolált Tokaj törzsek vizsgálatához

Az összes Tokaj törzs vizsgálatához 50 ml autoklávozott Tarcalon szüretelt Sárgamuskotály szőlőből préselt mustot (204.3 g/l cukortartalom, 6.38 g/l savtartalom, pH: 3.38)  $5 \times 10^6$  sejt  $\text{ml}^{-1}$  koncentrációjú egyéjszakás tenyésztéssel beoltottunk majd 12 °C-s termosztátban 30 napon keresztül inkubáltunk. Az erjedést két párhuzamos kísérletben vizsgáltuk. A cukor-, glükóz-, fruktóz-, és alkoholtartalom minden 5. napon meghatározásra került. A 30. napon az erjedés befejeződött és a borok maradék cukor-, glicerin-, végső alkohol-, teljes sav és az illósav-tartalma meghatározásra került Bruker Alpha FTIR spektrométer (Bruker Optic GmbH, Germany) alkalmazásával. Az eredményeket a Bruker OPUS szoftverrel értékeltük ki. A habképződést szemrevételezéssel figyeltük meg.

A 10-1347 (T7) és a 10-1358 (T22) törzsek további vizsgálatához 1 liter autoklávozott sárgamuskotály mustot (259,5 g/l cukor; 5,0 g/l sav; 3,69 pH) beoltottunk úgy, hogy a sejtszám a végtérfogatra vonatkoztatva  $5,0 \times 10^6$  sejt/ml legyen, majd 12 °C-os termosztátba tettük. Az erjedést két párhuzamos kísérletben vizsgáltuk. Az erjedés dinamikáját a must cukortartalmának a mérésével detektáltuk. Az elkészült borok alap analitikai elemzését elvégeztük a klaszikus módszerekkel, mely során meghatároztuk a kiejert borok alkohol-, cukor-, sav-, illósav tartalmát és pH értékét. A habképződést szemrevételezéssel figyeltük meg végig az erjedés alatt.

#### 4.9.2 Mikrovinifikáció a multistarterhez fejlesztéshez kiválasztott törzsek vizsgálatához

A *C. zemplinia*, *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* törzsek fiziológiai tulajdonságaiknak a megismeréséhez a törzseket Erlenmeyer lombikba oltottuk le YPGL 50 ml tápfolyadékba 20% w/v glükózzal, 0,1 OD értékkel, és 20 napos próbaerjesztést végeztünk két hőmérsékleten (12 °C és 25 °C).

Mivel borászati szempontból nagyon jelentősek a borminőség szempontjából az élesztők által termelt fermentatív aromaanyagok, így a kiválasztott *S. cerevisiae*, *S. uvarum* és *C. zemplinina* törzsekkel próbaerjesztést végeztünk sárgamuskotály mustban. A kiejedt borokat organoleptikus elemzéssel bíráltuk 20 pontos rendszerben (lásd 4.12 fejezet!).

Félüzemi erjesztési kísérletek a multistarter fejlesztéséhez:

Az erjesztési kísérleteket 2010 és 2011 évben a Tokaj Kereskedőház Zrt. borászati üzemében valósítottuk meg az alábbi térfogatokban:

- 1.: 150 liter acél tartályban kontroll: spontán erjedő
- 2.: 150 liter acél tartályban: *S. cerevisiae* (10-489) + *S. uvarum* (10-486) + *C. zemplinina* (10-374)
- 3.: 20 liter üvegballonban *S. cerevisiae* (10-489)
- 4.: 20 liter üvegballonban *S. uvarum* (10-486)
- 5.: 20 liter üvegballonban *C. zemplinina* (10-374)

Az erjesztési kísérleteket 2012 évben a Tokaji Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben végeztük el 20 liter térfogatban, üvegballonokban. A 2012-ben kiejedt borokat 100 pontos bírálati rendszerben értékeltük (lásd 4.12 fejezet!). 2013-ban a Majoros pincészetnél állítottuk be az erjesztési kísérletet

fahordókban. A kísérletekhez felhasznált mustok kezdeti cukor és savtartalmát a 7. táblázat tartalmazza.

7. Táblázat: A félüzemi erjesztési kísérletekhez felhasznált mustok összetétele

Évjárat	Fajta	Cukortartalom g/l	Savtartalom g/l	Kéntartalom szabad/összes mg/l
2010	Furmint	206,0	11,0	6/50
2011	Furmint	216,0	5,7	4/54
2012	Furmint	221,5	6,1	11/63
2013	Furmint	216,5	7,2	14/58

#### 4.9.3 A próbaerjesztések kivitelezése

A 2010 és 2011-ben végzett félüzemi erjesztési kísérletekhez a szüretet és a must előállítását a Tokaj Kereskedőház Zrt. munkatársai végezték.

A többi erjesztési kísérletekhez a furmint és sárgamuskotály szőlőt kézi szüreteléssel szedték a tarcali Bakonyi dűlőből. A szőlőt bogyóztuk és zúztuk. Melynek lényege a bogyók leválasztása a fűtőkről a káros polifenolok beoldódása elkerülése végett és kíméletes cefrévé alakítása. A kocsány és a szőlőmag mechanikai roncsolása és a cefrébe ázása rontaná a bor minőségét.

Ezután következett a mustválasztás, mely során préselést nem alkalmaztunk. Az így kapott mustfrakciót, az ún. színmustot használtuk fel a kísérleteinkben.

A must kezelése

A mustot 100 mg/liter szabad kénessav szinttel kénessavas nyálkázásnak és 12 órás ülepitésnek vetettük alá. A részlegesen letisztult mustot dekantáltuk az üledékről.

A problémamentes erjedés végett a must asszimilálható nitrogén tartalmát egy komplex élesztőtápanyaggal az Uvaferm UVAVITAL készítménnyel biztosítottuk három részletben a gyártói utasítás szerint: 10 g/hl adagot a beoltás előtt majd 10 g/hl adagot 30%-os cukorfogyás után majd legvégül 10g/hl tápanyagot az utóerjedési fázisban adagoltunk a musthoz.

Az Uvaferm UVAVITAL egy komplex tápanyag az élesztők részére, ami élesztősejtfalat, ammónium-sókat, aminosavakat, peptideket, poliszaharidokat, tiamint, riboflavint, biotint, Ca-pantotenátot, folsavat, niacint, magasabb szénatomszámú telítetlen zsírsavakat és szterolokat tartalmaz. Ezáltal biztosítja a fermentáció alatt a szükséges nitrogén szintet. A nitrogén az egyik legfontosabb tápanyag az élesztők részére, esszenciális a fehérjék szintéziséhez és a transzportfolyamatokhoz. A tiamin nélkülözhetetlen a fehérjeszintézishez, enzimek aktivitásához és a sejtfalszintézishez. A tápanyag utánpótlás hatására csökken az elhúzódó, elakadó fermentációnak az esélye.

Beoltás starter kultúrával

Mind a labor léptékű mind a félüzemi erjesztésnél folyékony táptalajban (YPGL) felszaporított élesztő kultúrával történt a beoltás. A törzsek felszaporítása 25 °C-on történt. A beoltást  $5,0 \times 10^6$  sejt/ml végtérfogatra beállított sejtkoncentrációval végeztük. A sejtszámmeghatározást Bürker-kamrával végeztük. A beoltásra használt sejtszuszpenziók térfogata a beoltandó must mennyiségéhez arányosítva egyforma volt. A tiszta tenyészeteknél (10-374, 10-486 és 10-489) esetében

3/3, míg a kevert multistarter esetében  $1/3$  10-486 +  $1/3$  10-489 +  $1/3$  10-374 térfogat egység volt.

Az erjedési hőmérséklet minden esetben  $12\text{ }^{\circ}\text{C}$  volt. Az élesztők fitnesszére károsan ható hősök elkerülése végett több lépcsőben,  $5^{\circ}\text{C}$ -onként hideg,  $12^{\circ}\text{C}$ -os musttal hűtöttük le az élesztők oldatát a kívánt erjedési hőmérsékletre ( $12^{\circ}\text{C}$ ). A már lehűlt élesztő oldattal oltottuk be az erjeszteni kívánt mustot.

Mintavételezés

A borászati analitikai mérésekhez és az általunk beoltott törzsek nyomon követéséhez az erjedés alatt 7 naponta vettünk mintát.

Borkezelés

Az erjedés befejeztével a félüzemi tételeket megkéneztük úgy, hogy a szabad kén szint  $40\text{ mg/l}$  legyen az illatanyagok megőrzése és az oxidáció elkerülése végett.

#### 4.10. Klasszikus boranalitikai vizsgálatok

A cukor-, alkohol-, sav-, illósav tartalom meghatározását klasszikus analitikai módszerekkel a Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Szervezet (OIV) a Bor és mustvizsgálat nemzetközi módszereinek gyűjteménye (Master OIV.,2023) szerint végeztük el. A vizsgált paraméterekre alkalmazott módszer leírások azonosítóját a 8. táblázat tartalmazza.

8.táblázat: Alkalmazott klasszikus boranalitikai módszerek

<b>Vizsgált paraméter</b>	<b>Alkalmazott OIV módszer</b>
Alkoholtartalom	OIV-MA-AS312-01A
Összes szárazextrakt- tartalom	OIV-MA-AS2-03A
Redukáló cukor tartalom	OIV-MA-AS311-01A
Illósavtartalom	OIV-MA-AS313-02A
Kén-dioxid tartalom	OIV-MA-F1-07
Összes sav tartalom	OIV-MA-AS313-01

#### 4.11 Műszeres analitikai módszerek

A *C. zemplinina* törzsek vizsgálata során az alkoholtermelő képességét a fermentléből kimutatható etanol koncentrációjának a meghatározásával állapítottuk meg, amihez a TDI Alcoquick 4000 infravörös analizátort használtuk. Az ecetsav és almasav termelést a törzsek egyéjszakás tenyésztésével beoltott YPGL tápfolyadék fermentlevének analitikai mérésével TDI MiuraOne automata boranalizátorral határoztuk meg.

A Soós és Ásvány által izolált törzsek vizsgálata során a teljes cukortartalom, teljes savtartalom, glükóz-, fruktóz-, glicerin-, ecetsav-, és alkohol koncentráció Bruker Alpha FTIR spektrométer (Bruker Optic GmbH, Germany) alkalmazásával került meghatározásra. A mérési adatokat a Bruker OPUS szoftverrel dolgoztuk fel.

Illékony vegyületek HS-GC-MS elemzése (gőztéradagoló és mintaelőkészítő, gázkromatográf és tömegspektrométer kapcsolt technika)

A borok illékony aromakomponenseinek meghatározását Bruker Scion 436 gázkromatográfal végeztük, amelyhez Bruker SQ tömegspektrométert kapcsolunk. A rendszer DB-5MS kapilláris oszlopot (25 m 0,25 mm i. d. 1,0 µm filmvastagság) tartalmazott. A vivőgáz hélium 5,0 volt, az áramlási sebesség 0,9 ml/perc volt állandó áramlási módban. A mintákat 40 °C-on 20 percig inkubáltuk a headspace-üvegekben, keverés nélkül a Bruker SHS-40 automata gőztéradagoló mintaváltóban. 1000 µl headspace-mintát injektáltunk az oszlopra. A transzfervezetékét 230 °C-on,

az injektor hőmérsékletét 250 °C-on tartottuk (20:1 szplit arány). A kemencét 2 percig 40 °C-os kezdeti hőmérsékleten tartottuk, majd 10 °C/perc sebességgel 280 °C-ra emeltük, és 3 percig tartottuk ezen a hőmérsékleten. A tömegspektrumokat teljes pásztázási módban vettük fel. Az illékony vegyületek azonosítása a National Institute of Standards and Technology (NIST) tömegspektrometriai könyvtárából (2005-ös verzió) nyert tömegspektrometriai adatokon alapult.

#### 4.12 Organoleptikus bírálat

A borok legelfogadottabb és legelismertebb minőségi értékelését hagyományosan borszakértő emberekből álló bizottságok végzik. A Nemzetközi Szőlészeti és Borászati Szervezet (OIV) 100 pontos módszere a legszélesebb körben alkalmazott érzékszervi módszer a borok minősítésére (OIV332a). Az OIV módszer öt előre meghatározott érzékszervi kategóriát használ, amelyek minden bortípusra alkalmazhatók, és így képesek megkülönböztetni a magas és alacsony minőséget (9. táblázat).

A módszer egyszerűsített változata a 20 pontos bírálati rendszer. A 20 pontos bírálat során a bor színét (fehérbornál 2, vörösbornál 4 pont adható), tisztaságát (max. 2 pont), illatát (max. 4 pont), íz, zamat, összbenyomását (fehérbornál 12, vörösbornál 10 pont) értékeljük.

9. Táblázat: OIV332a 100 pontos bírálati rendszer értékelő lapja

	Csendes borok	Kiváló	Nagyon jó	Jó	Megfelelő	Elégtelen
Megjelenés	Tisztaság	5	4	3	2	1
	Szín	10	8	6	4	2
Illat	Intenzitás	8	7	6	4	2
	Fajtakarakter	6	5	4	3	2
	Minőség	16	14	12	10	8
Zamat	Intenzitás	8	7	6	4	2
	Fajtakarakter	6	5	4	3	2
	Minőség	22	19	16	13	10
	Hosszúság	8	7	6	5	4
Összbenyomás		11	10	9	8	7
Összesen		40-100				

#### 4.13 Statisztikai módszer:

A Soós és Ásvány. (1950) által izolált Tokaj törzsek mikrovinifikációs kísérlete során végzett analitikai mérések megbízhatóságának meghatározására a Fisher-tesztet (MANOVA) alkalmaztuk (Sváb, 1979).

## 5. Eredmények

### 5.1 A Soós és Ásvány. által izolált Tokaj törzsekre vonatkozó morfológiai, fiziológiai és genotipizálási eredmények

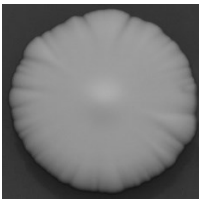
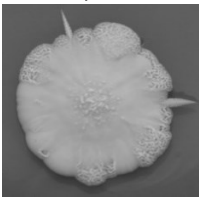
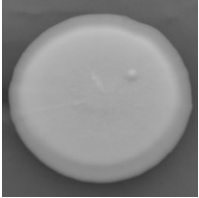
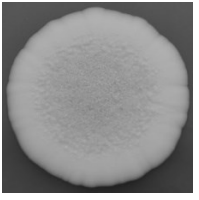
A 22 törzs tulajdonságait kísérleti eredmények alapján Soós és Ásvány. (1950) leírták. A törzsek között morfológiai és fiziológiai eltéréseket tapasztaltak. A törzseket mi is megvizsgáltuk, hogy az eredményeinket összevethessük a korabeli eredményekkel és megismerjük, hogy a tulajdonságaik miként változtak meg a több, mint 100 éves törzsfenntartás során.

#### 5.1.1 Morfológia

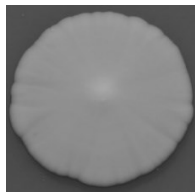
Makromorfológiát tekintve hat eltérő típust különböztettek meg Soós és Ásvány (1950). A megfigyeléseink alapján mi három jól elkülöníthető típust találtunk. A telepek általában világos krémszínűek, sima vagy enyhén szektoros felületűek, teljes vagy enyhén hullámos telepszélekkel. Ettől a 10-1344 és a 10-1358 törzsek morfológiája tér el jelentősen. A 10-1344 törzs ráncos felületű, durva szektoros és erezett szélű telepet képez, míg a 10-1358 sima felületű, de erősen széttagolt telepet képez, amely nagyon hullámos szélekkel rendelkezik (10. Táblázat).

10. táblázat: A Tokaj törzsek törzsek és a kontroll Uvaferm 43 törzs

óriástelep morfológiája (n=1):

Telep képe, Ø és azonosító száma	Régi jellemzés Soós és Ásvány 1950.	Új jellemzés
 10-1343 (T1) Ø= 17,5 mm	Fénye: csillogó Színe: fehér Széle: csipkés Kiemelkedés: kiemelkedő Felülete: egyenletes, sima	Fénye: matt Színe: fehér Széle: kicsi szabálytalan lebenyes Kiemelkedés: kiemelkedő Felülete: sima
 10-1344 (T2) Ø= 30,6	Fénye: csillogó Színe: szürke Széle: hullámos Kiemelkedés: kiemelkedő Felülete: radiális	Fénye: fél-csillogó Színe: vajszínű Széle: nagyobb szabálytalan lebenyek Kiemelkedés: kiemelkedő Felülete: strukturált
 10-1345 (T4) Ø= 21,4 mm	Fénye: csillogó Színe: szürke Széle: lebenyes Kiemelkedés: jól kiemelkedő Felülete: radiális, tagolt	Fénye: matt Színe: vajszínű Széle: ép Kiemelkedés: kiemelkedő Felülete: sima
 10-1346 (T5) Ø= 34,0 mm	Fénye: csillogó Színe: fehér Széle: ép Kiemelkedés: jól kiemelkedő Felülete: egyenletes, sima	Fénye: matt Színe: vajszínű Széle: ép Kiemelkedés: kiemelkedő Felülete: strukturált

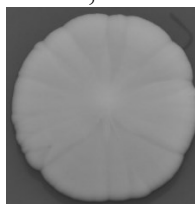
Telep képe, Ø és  
azonosító száma



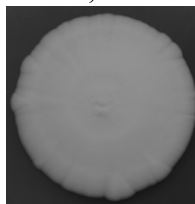
10-1347 (T7)  
Ø= 29,1 mm



10-1348 (T8)  
Ø= 24,2 mm



10-1349 (T9)  
Ø= 27,2 mm



10-1350 (T10)  
Ø= 32,2 mm



10-1351 (T11)  
Ø= 31,6 mm

Régi jellemzés Soós és  
Ásvány 1950.

Fénye: viaszos  
Színe: fehér  
Széle: ép  
Kiemelkedés: lapos  
Felülete: egyenletes, sima

Fénye: viaszos  
Színe: szürke  
Széle: hullámos  
Kiemelkedés: kiemelkedő  
Felülete: radiális

Fénye: viaszos  
Színe: fehér  
Széle: hullámos  
Kiemelkedés: kiemelkedő  
Felülete: fodros

Fénye: csillogó  
Színe: fehér  
Széle: csipkés  
Kiemelkedés: kiemelkedő  
Felülete: radiális

Fénye: csillogó  
Színe: fehér  
Széle: ép  
Kiemelkedés: jól  
kiemelkedő  
Felülete: radiális, tagolt

Új jellemzés

Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: ép  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: sima

Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: nagyobb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

Fénye: matt  
Színe: vajszerű  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

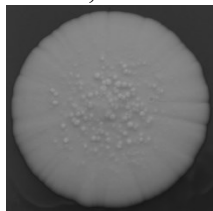
Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

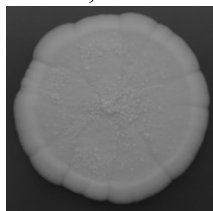
Telep képe, Ø és  
azonosító száma



10-1352 (T12)  
Ø= 33,9 mm



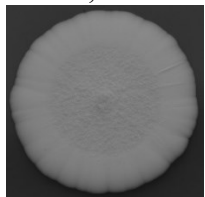
10-1353 (T13)  
Ø= 30,7 mm



10-1354 (T15)  
Ø= 34,1 mm



10-1355 (T18)  
Ø= 34,0 mm



10-1356 (T19)  
Ø= 34,5 mm

Régi jellemzés Soós és  
Ásvány 1950.

Fénye: csillogó  
Színe: szürke  
Széle: hullámos  
Kiemelkedés: kiemelkedő  
Felülete: egyenletes, sima

Fénye: csillogó  
Színe: sárgás  
Széle: hullámos  
Kiemelkedés: jól  
kiemelkedő  
Felülete: radiális

Fénye: csillogó  
Színe: szürke  
Széle: hullámos  
Kiemelkedés: kiemelkedő  
Felülete: radiális

Fénye: csillogó  
Színe: szürke  
Széle: hullámos  
Kiemelkedés: kiemelkedő  
Felülete: radiális, léces  
ránövés

Fénye: viaszos  
Színe: szürke  
Széle: csipkés  
Kiemelkedés: jól  
kiemelkedő  
Felülete: radiális

Új jellemzés

Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: sima

Fénye: matt  
Színe: vajszerű  
Széle: nagyobb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

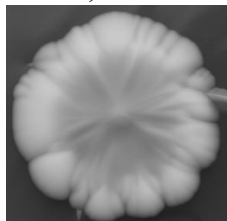
Fénye: matt  
Színe: vajszerű  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

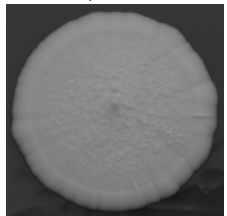
Telep képe, Ø és  
azonosító száma



10-1357 (T21)  
Ø= 31,5 mm



10-1358 (T22)  
Ø= 15,2 mm



10-1359  
Ø= 29,1 mm



Uvaferm 43  
Ø= 33,6 mm

Régi jellemzés Soós és  
Ásvány 1950.

Fénye: csillogó  
Színe: szürke  
Széle: hullámos  
Kiemelkedés: kiemelkedő  
Felülete: fodros

Fénye: csillogó  
Színe: szürke  
Széle: hullámos  
Kiemelkedés: lapos  
Felülete: radiális

n.d.

n.d.

Új jellemzés

Fénye: félig fénylő  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

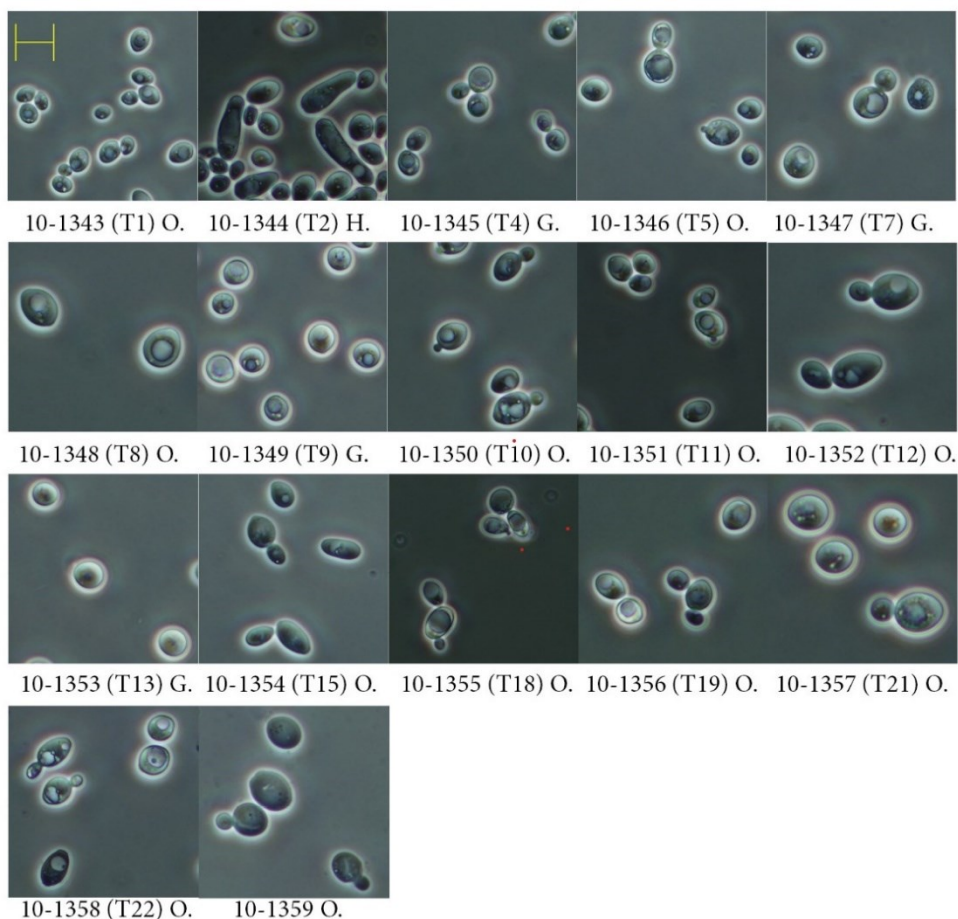
Fénye: matt  
Színe: vajszerű  
Széle: nagyobb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

Fénye: matt  
Színe: fehér  
Széle: kisebb  
szabálytalan lebenyek  
Kiemelkedés:  
kiemelkedő  
Felülete: strukturált

Mikroszkópos megfigyeléseink során morfológiai szempontból három kategóriába tudtuk a törzseket elkülöníteni (2. ábra): gömb alakú (10-1345 T4, 10-1347 T7, 10-1349 T9, 10-1353 T13), ovális (10-1343 T1, 10-

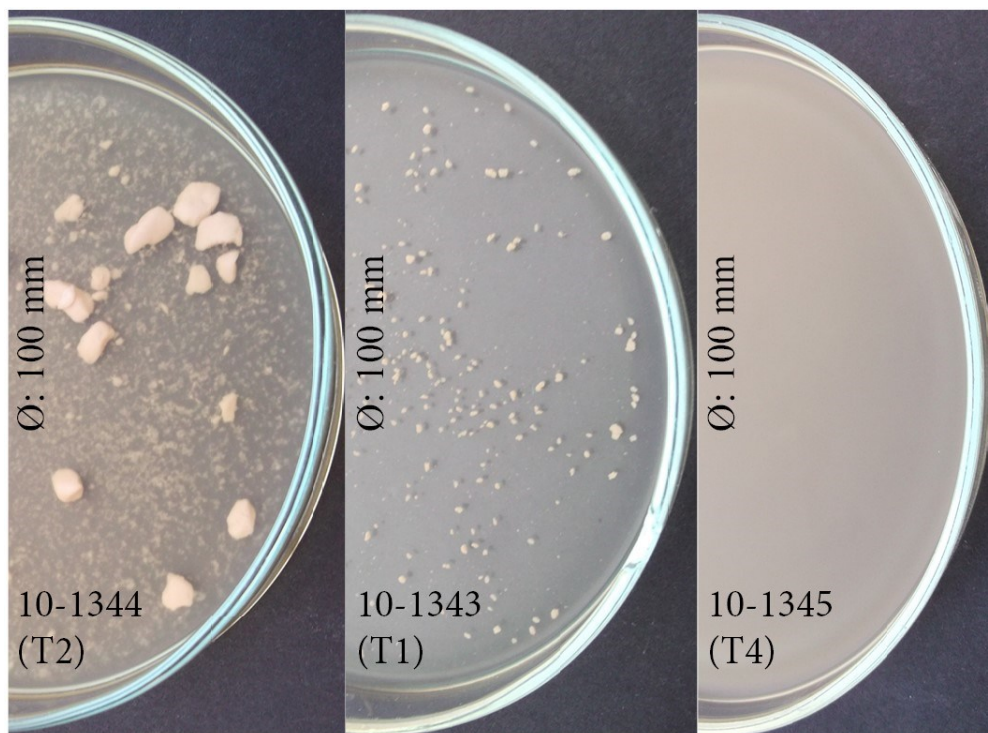
1346 T5, 10-1348 T8, 10-1350 T10, 10-1351 T11, 10-1352 T12, 10-1354 T15, 10-1355 T18, 10-1356 T19, 10-1357 T21, 10-1358 T22, 10-1359) és hosszúkás (10-1344 T2) sejtalakokat figyeltünk meg. Soós és Ásvány. (1950) hosszúkás sejtmorfológiával a 10-1354-es T15 törzset, a többi „gömbölydednek” (10-1343 T1, 10-1347 T7, 10-1350 T10, 10-1356 T19) és oválisnak jellemezték (Melléklet 1. táblázat). A sejtformától függetlenül, minden törzs multilaterális sarjadzással szaporodott. A sejtek méretét mikroszkópos méréssel 10-10 sejt hosszabb és rövidebb oldalának megméréseivel állapítottuk meg. A sejtek méretét a Mellékletek 2. táblázata tartalmazza.



2. ábra: A sejtek morfológiája fáziskontraszt mikroszkópos felvételeken 400X nagyításon. A sárga méretjelölő hossza 10,0  $\mu\text{m}$ . O: ovális; H: hosszúkás; G: gömbölyű sejt morfológia

Folyékony tenyészetben a 10-1344 (T2) erősen, míg a 10-1343 (T1) törzs kevésbé, de aggregálódott. A többi törzsre ez nem volt jellemző (3. ábra). Soós és Ásvány (1950) a 10-1343 (T1) és a 10-1344-es (T2) törzset szintén „csomós” üledék képzőknék, míg a többi törzset „poros”

üledésüként jellemezték. A 10-1344 (T2) sejt morfológiája eltér az összehasonlítástól. Sejtjei nagyobb méretűek ovális, illetve megnyúlt alakúak, aggregálódásra hajlamosak. A 10-1344 (T2) törzs 3-5 mm átmérőjű, szabálytalan aggregátumokat képez, ezáltal rendkívül gyorsan kiülepedik. Ez a tulajdonság előnyös a borkészítésnél, mivel erjedés után a bor tisztítása könnyebbé válik. Soós és Ásvány (1950) azt tapasztalták, hogy a magas 431,1 mg/l összes kénessavat tartalmazó mustoknak csak a „csomós” üledésű törzsek (10-1343, 10-1344) tudták az erjedését beindítani.



3. ábra: Erősen aggregálódott tenyészet 10-1344 (T2); aggregálódott tenyészet 10-1343 (T1); nem aggregálódott tenyészet 10-1345 (T4)

### 5.1.2 Spórázási képesség

A spórázási képességük alapján Soós és Ásvány (1950) 4 csoportot különítettek el. Nem spórázók: 10-1345 (T4), 10-1352 (T12), 10-1353 (T13), 10-1358 (T22); Alig spórázók (az aszkuszban ritkán 1-2 spóra megfigyelhető): 10-1344 (T2), 10-1354 (T15), 10-1357 (T21), az aszkuszban 1-4 spóra van és 50-80%-ban spórázók: 10-1346 (T5), 10-1349 (T9), Igen jól spórázók (az aszkuszban 1-4 spóra van és a sejtek 80-90%-a sprórás): 10-1350 (T10), 10-1351 (T11);. Saját megfigyeléseink alapján a spórázási képességük csökkent a törzseknek, kivétel a 10-1352 (T12) és a 10-1344 (T2) törzsek. 9 törzs nem spórázott (10-1343 (T1), 10-1345 (T4), 10-1347 (T7), 10-1348 (T8), 10-1349 (T9), 10-1353 (T13), 10-1354 (T15), 10-1355 (T18), 10-1358 (T22). Alig spórázott a 10-1351 (T11): 3%, 10-1356 (T19): 2 %, 10-1357 (T21): 4%, 10-1359: 1%. Ennél erősebben spórázott a 10-1344 (T2): 10%, 10-1352 (T12): 8%. 10-1346 (T5): 12%, legerősebben spórázott a 10-1350 (T10): 20 % (12. táblázat). Érdekesség, hogy a 10-1352 (T12) Soósék vizsgálata alapján a nem spórázók csoportba került besorolásra, a mi vizsgálataink során viszont a sejtjei 8%-a spórázást mutatott. Soós és Ásvány (1950) cikkében is megemlítik, hogy vannak törzsek, melyek korábbi vizsgálatok során nem, majd másik vizsgálatban mégis spóráltak. a Tokaj izolátumok közül a Tokaj 5-t (10-1346, T5) említik példaként.

### 5.1.3 Fiziológiai eredményeink

A 12. táblázatban összevetettük a törzsek fiziológiai tulajdonságát a korabeli és a saját eredményeinkkel. Bizonyos törzseknél különbségeket találtunk az inulin és a raffinóz felhasználása között. Továbbá a törzseket borászati szempontból releváns tulajdonságokra is megvizsgáltuk, amelyeket 68 évvel ezelőtt nem vizsgáltak.

#### 5.1.3.1 Kénhidrogén termelés

Biggy táptalajon (Scharlau) 12 °C-on két törzs termelt kevesebb H<sub>2</sub>S-t, mint a kontrollként használt kereskedelmi starterkultúra. Tápfolyadékban tenyésztett sejteket ólom acetátos tesztcsikkal vizsgálva nyolc törzs nem termelt detektálható mennyiségű H<sub>2</sub>S-t a kontrollon kívül. Az eredményeket a 12. táblázat tartalmazza.

#### 5.1.3.2 Savtermelés vizsgálata

A legtöbb törzs kevésbé bizonyult acidogénnek, mint a kontrollként használt kereskedelmi starterkultúránk a vizsgálat 30. napján. A 10-1344 (T2) és a 10-1352 (T12) törzsek mutattak nagyobb feltisztulási zónát, míg a 10-1347 (T7) és a 10-1357 (T 21) ugyan akkorát, mint a kontroll törzs (11. táblázat). A 10-1344 (T2), 10-1345 (T4), 10-1346 (T5), 10-1347 (T7), 10-1357 (T21) és a 10-1358 (T22) a vizsgálat 5. napján kétszer akkora (2mm) feltisztulási zónával rendelkezett, mint a kontroll Uvaferm 43 törzs. A feltisztulási zóna a telep szélétől a zóna széléig mért távolsággal jellemeztük.

11. táblázat: A Tokaj törzsek savtermelő képessége Custer féle krétás agaron. A feltisztulási zóna mérete a telep szélétől a zóna széléig mért távolság. (n=2)

Törzs	Savtermelés (feltisztulási zóna mm)	
	Custer féle krétás agaron	
	5 nap	1 hónap
Uvaferm 43	1,00±0,00	7,00±0,00
10-1343 (T1)	1,00±0,00	3,25±0,35
10-1344 (T2)	2,00±0,00	7,75±0,35
10-1345 (T4)	1,75±0,35	6,00±0,00
10-1346 (T5)	2,00±0,00	6,00±0,00
10-1347 (T7)	2,00±0,00	7,20±0,35
10-1348 (T8)	1,50±0,00	5,00±0,00
10-1349 (T9)	1,50±0,00	5,25±0,35
10-1350 (T10)	1,00±0,00	4,00±0,00
10-1351 (T11)	1,00±0,00	5,75±0,35
10-1352 (T12)	1,50±0,00	8,00±0,00
10-1353 (T13)	1,00±0,00	4,00±0,00
10-1354 (T15)	1,00±0,00	6,00±0,00
10-1355 (T18)	1,00±0,00	4,50±0,71
10-1356 (T19)	1,00±0,00	4,00±0,00
10-1357 (T21)	2,00±0,00	7,00±0,00
10-1358 (T22)	2,00±0,00	4,50±0,71
10-1359	1,00±0,00	2,00±0,00

### 5.1.3.3 Killer aktivitás

Két törzs a 10-1346 (T5) és a 10-1354 (T15) mutatott killer aktivitást, két törzs a 10-1343 (T1) és a 10-1358 (T22) semleges tulajdonságú (se nem killer se nem szenzitív), a többi törzs szenzitívnek bizonyult a teszthez használt törzsek K1 és K2 toxinjaira (12. táblázat).

12. táblázat: A Tokaj törzsek fiziológiai tulajdonságai

Törzs	Sporuláció <sup>a</sup>		H <sub>2</sub> S termelés		Killer f. s <sup>d</sup>	galaktóz felhasználás <sup>e</sup>		inulin felhasználás <sup>e</sup>		raffinóz felhasználás <sup>e</sup>	
	Régen <sup>f</sup>	Most	Nickers on agaron <sup>b</sup>	Fermentáció alatt <sup>c</sup>		Régen <sup>f</sup>	Most	Régen <sup>f</sup>	Most	Régen <sup>f</sup>	Most
10-1343 (T1)	**	-	1	-	N	+	+	-	-	+	w
10-1344 (T2)	*	*(10%)	3	-	S	+	+	-	-	+	+
10-1345 (T4)	-	-	3	BBB	S	+	+	-	-	+	w
10-1346 (T5)	***	** (12%)	4	B	K	+	+	-	-	+	+
10-1347 (T7)	**	-	3	BBB	S	+	+	-	-	+	+
10-1348 (T8)	*	-	2	BBB	S	+	+	w	-	+	+
10-1349 (T9)	***	-	3	BB	S	+	+	-	-	-	+
10-1350 (T10)	****	** (20%)	3	-	S	+	+	-	-	+	+
10-1351 (T11)	****	*(3%)	4	-	S	+	+	+	-	-	+
10-1352 (T12)	-	*(8%)	4	B	S	+	+	-	-	+	+
10-1353 (T13)	-	-	4	BB	S	+	+	-	-	+	w
10-1354 (T15)	***	-	4	B	K	+	+	w	-	+	+
10-1355 (T18)	*	-	4	BB	S	+	+	w	-	+	+
10-1356 (T19)	**	*(2%)	4	-	S	+	+	-	-	+	w
10-1357 (T21)	*	*(4%)	4	-	S	+	+	-	-	+	+
10-1358 (T22)	-	-	1	-	N	+	+	-	-	+	w
10-1359	n.a.	*(1%)	4	-	S	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	w
Uvaferm 43	n.a.	n.a.	2	-	S	n.a.	+	n.a.	-	n.a.	+

<sup>a</sup> -: nincs sporuláció; \*: 1-10 % sporuláció; \*\*: 10-50% sporuláció; \*\*\*: 50-80% sporuláció, \*\*\*\*: 80-90% sporuláció

<sup>b</sup> Telep színe 12 °C-on. skála világostól (1) sötét barnáig (4)

<sup>c</sup> -: nincs reakció a tesztsíkon; B: gyenge barnulás reakció a tesztsíkon; BB: közepes barnulás reakció a tesztsíkon; BBB: intenzív barnulás reakció a tesztsíkon

<sup>d</sup> K: killer; S: szenzitív mindkét K1 és K2 killer toxinra; N: semleges (se nem killer se nem szenzitív)

<sup>e</sup> -: nincs növekedés; w: gyenge növekedés; +: növekedés

<sup>f</sup> Soós és Ásvány, 1950 szerint

n.a.: nincs adat

#### 5.1.3.4 Ozmotolerancia vizsgálat

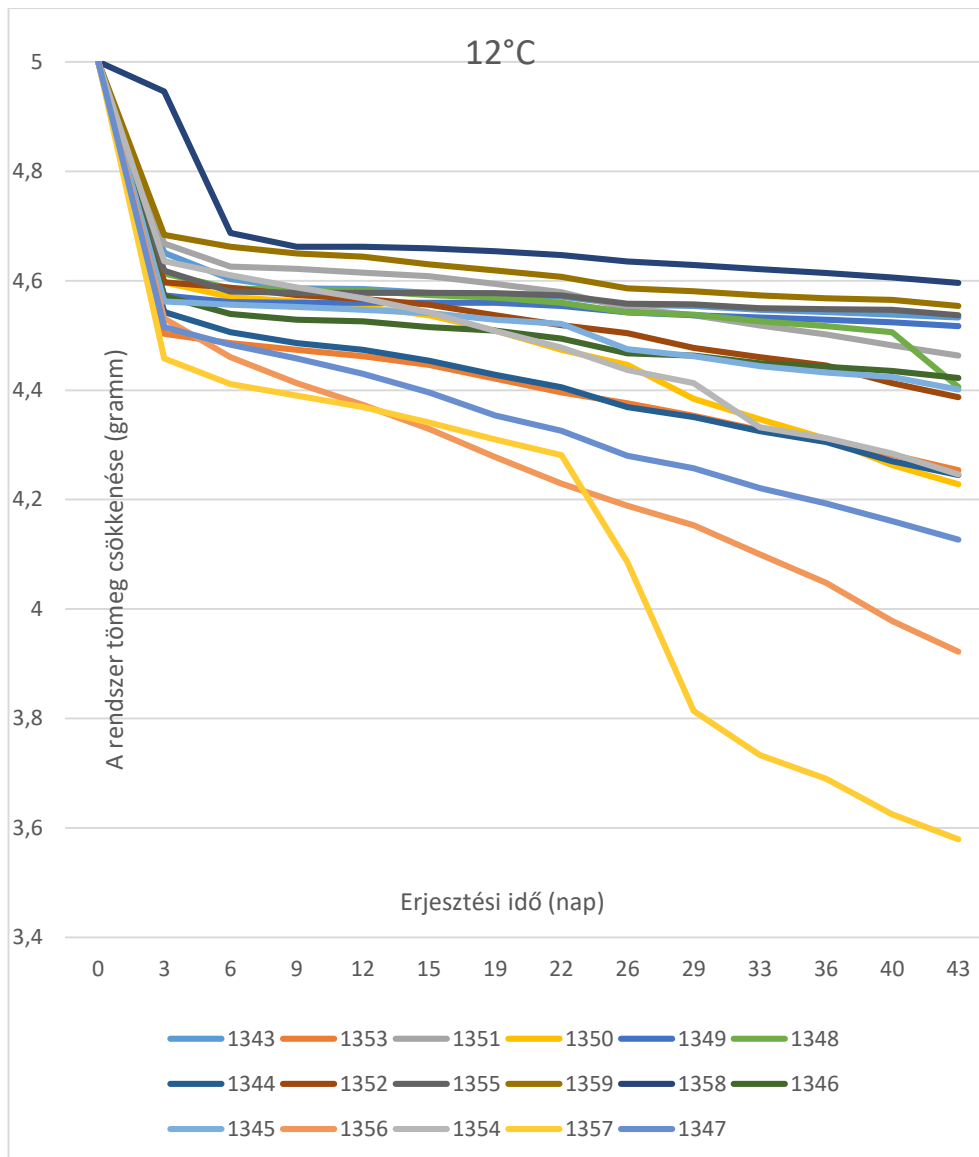
Egy törzs kivételével (10-1343) mindegyik ozmotoleránsabb volt, mint a kontroll (Uvaferm 43) kereskedelmi starterkultúra (13. táblázat). A korabeli vizsgálatok szerint a 35% w/v cukortartalmú mustot mindegyik törzs elkezdte erjeszteni, bár teljesen egyik sem tudta kierjeszteni. A leginkább ozmotoleráns törzsnek a 10-1358 (T22) mutatkozott, a 60% w/v cukortartalmú must erjedését egyedül a T22 volt képes megindítani Soós és Ásvány (1950) szerint. Viszont a vizsgálataink alapján a 10-1343 T1 majd azt követően a 10-1358 T22 törzs bírja legkevésbé elviselni a magas cukorkoncentrációt.

13. táblázat: A törzsek növekedése különböző glükóz koncentráció mellett (n=1); +: növekedés, -: nincs növekedés, W: gyenge növekedés (Mellékletek 1. ábra)

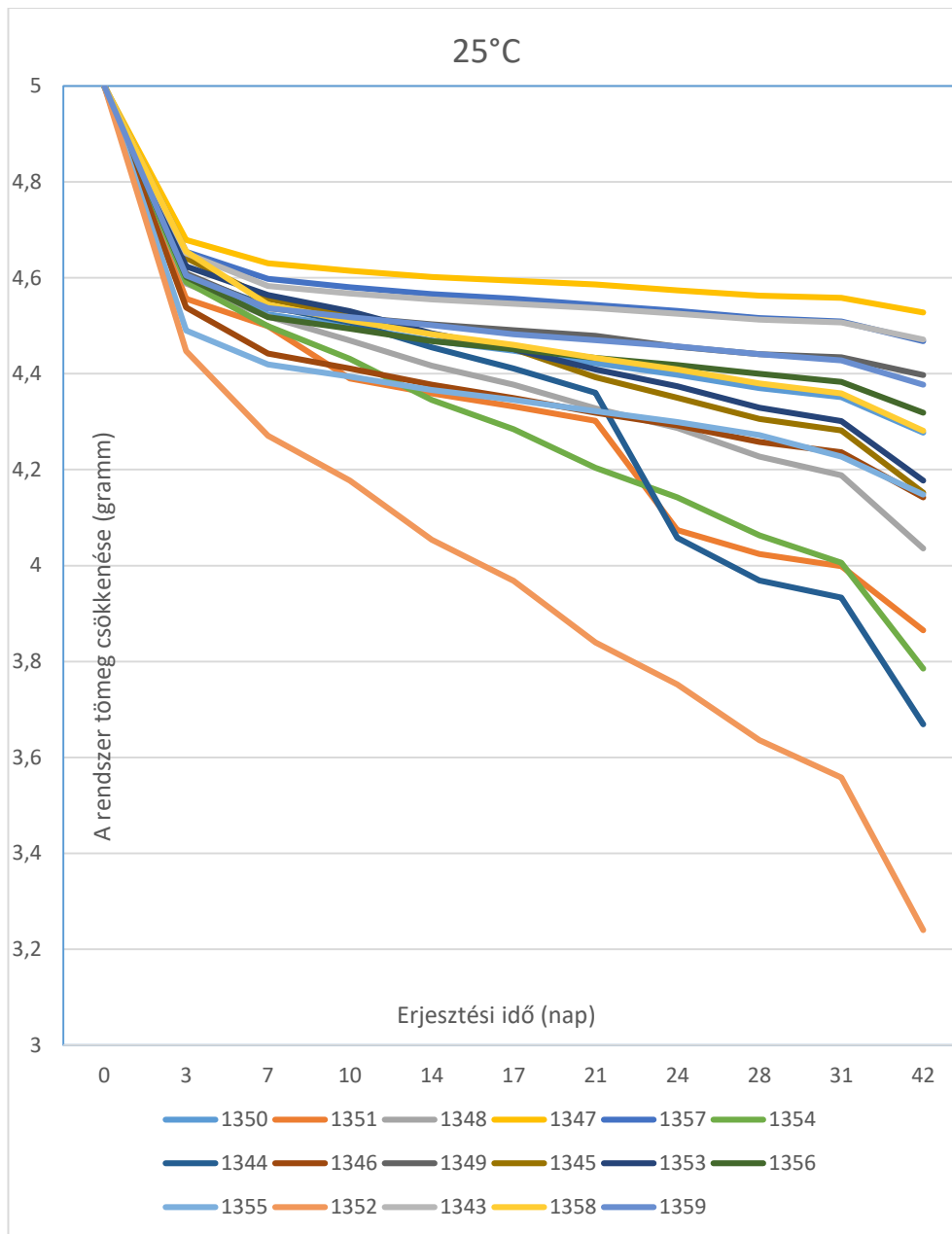
Törzs	Glükóz koncentráció YPGA táptalajban			
	20 % w/v	30 % w/v	40 % w/v	50 % w/v
10-1343 (T1)	+	-	-	-
10-1344 (T2)	+	+	W	-
10-1345 (T4)	+	+	W	-
10-1346 (T5)	+	+	W	-
10-1347 (T7)	+	+	W	-
10-1348 (T8)	+	+	W	-
10-1349 (T9)	+	+	W	-
10-1350 (T10)	+	+	-	-
10-1351 (T11)	+	+	W	-
10-1352 (T12)	+	+	W	-
10-1353 (T13)	+	+	W	-
10-1354 (T15)	+	+	W	-
10-1355 (T18)	+	+	W	-
10-1356 (T19)	+	+	W	W
10-1357 (T21)	+	+	W	-
10-1358 (T22)	+	W	-	-
10-1359	+	+	W	-
Uvaferm 43	+	+	-	-

### 5.1.3.5 Erjesztési erély meghatározása a CO<sub>2</sub> elillanásából származó tömegveszteség mérése alapján

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy a hosszú időn át tartó mesterséges törzsfenntartás hatására miként változott meg az erjesztési képessége a törzseknek próbaerjesztéseket végeztünk el 12 °C és 25 °C-on. Az erjedés során elillanó CO<sub>2</sub> mértékéből megállapítottuk a törzsek erjesztési erélyét. 12 °C-on a 10-1357 (T21), 10-1356 (T19) és a 10-1347 (T7) törzsek erjesztettek a legintenzívebben és a 10-1358 (T22) és a 10-1359-es törzsek bizonyultak a leggyengébbeknek (4. ábra). 25 °C-on a 10-1352 (T12), 10-1355 (T18), és a 10-1344 (T2) törzsek bizonyultak a legerőteljesebb erjesztőknek és a 10-1347 (T7), 10-1357 (T21) és a 10-1343 (T1) bizonyultak a leggyengébbnek. (5. ábra).



4. ábra: A Tokaj törzsek erjesztési erélye 12 °C-on a CO<sub>2</sub> elillanásából származó tömegvesztés mérés alapján (n=1). A görbék az egyes lombikok (rendszerek) tömegének csökkenését mutatják, mely mértéke a képződött CO<sub>2</sub> elillanásával arányos.



5.ábra: A Tokaj törzsek erjesztési erélye 25 °C-on a CO<sub>2</sub> elillanásából származó tömegvesztés mérés alapján (n=1). A görbék az egyes

lombikok (rendszerek) tömegének csökkenését mutatják, mely mértéke a képződött CO<sub>2</sub> elillanásával arányos.

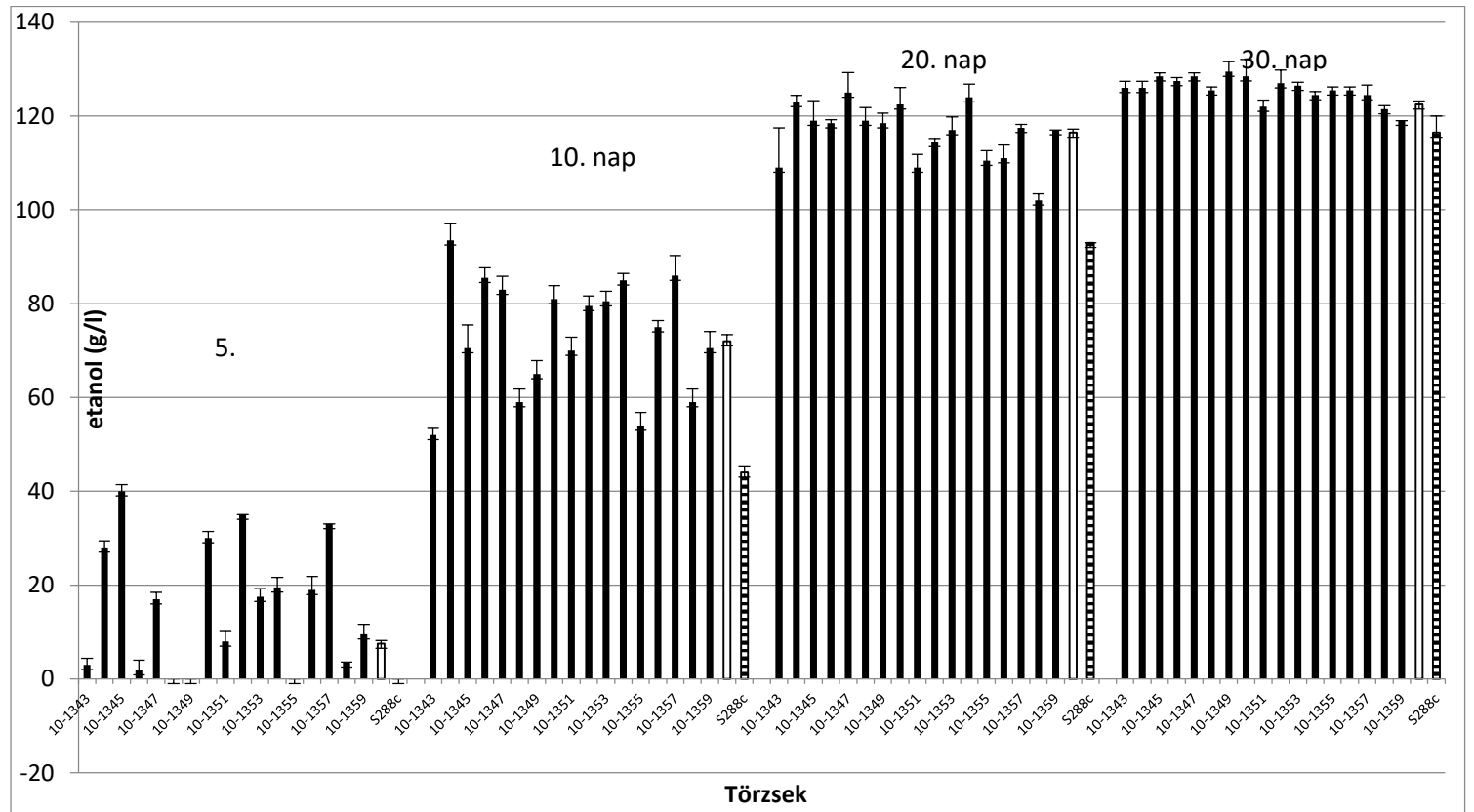
#### 5.1.4 Mikrovinifikáció

Az 50 ml autoklávozott Tarcalon szüretelt Sárgamuskotály szőlőből préselt must (204.3 g/l cukortartalom, 6.38 g/l savtartalom) kiejlesztése során nagyfokú diverzitást tapasztaltunk a törzsek erjesztési erélyében, ami a fermentáció első öt napjában megfigyelt eltérő cukor fogyasztásban és alkohol termelésben nyilvánult meg. A kezdeti különbségek fokozatosan kiegyenlítődtek az erjedés későbbi fázisában. (6. ábra)

A harminc napos fermentációs idő végére a kezdeti 204,3 g/l cukortartalom 2.05-6.25 g/l –re csökkent a Tokaji izolátumok által. Az S288C laboratóriumi törzs által erjedt mintában 11.70 g/l volt mérhető. (14. táblázat). A végső etanol-tartalom csak kis mértékben változatos; a legalacsonyabb (S288c) és a legmagasabb (10-1349 T9) érték között a különbség 13 g/l. A magas végső alkoholtartalom azt mutatja, hogy az összes Tokaj törzs elég jó alkohol toleranciával és jó cukor-alkohol konverziós képességgel rendelkezik.

Minden Tokaji törzs glükofilnek bizonyult (13. táblázat) de eltérő fokban. A 10-1343 (T1) és a 10-1348 (T8) törzsekkel erjesztett borokban a maradék cukor nem tartalmazott glükózt és a 10-1351 (T11) törzsszel erjesztett borban 25-ször kevesebb glükóz maradt, mint fruktóz. Az összes titrálható savtartalomban és a végső glicerin-tartalomban csak minimális eltéréseket észleltünk, de az ecetsav tartalom tekintélyes diverzitást mutatott. Minden törzs habképzése alacsony mértékű volt.

Soós és Ásvány (1950) szerint a 10-1345 (T4) törzs volt a legjobb alkohol termelő, és a 10-1347 (T7) és a 10-1358 (T22) törzseket ajánlották leginkább beoltásra a bor erjesztéséhez, mert képesek voltak magas cukor tartalmú mustokat is kiereszteni és kellemes aroma komponenseket termeltek. A mi vizsgálatainkban ezek közül két törzs a 10-1345 (T4) és a 10-1347 (T7) bizonyultak nagyon jó alkohol termelőknek és a harmadik, a 10-1358 (T22) termelte a legnagyobb mennyiségű glicerint (14. táblázat). A kísérleteinkben tapasztalt ezen törzsek jó teljesítménye demonstrálja, hogy nem veszítették el a borászati tulajdonságaikat a több, mint 10 évtizedig tartó mesterséges törzsfenntartás során.



6. ábra: A Tokaj törzsek etanoltermelésének dinamikája a mikrovinifikáció során.

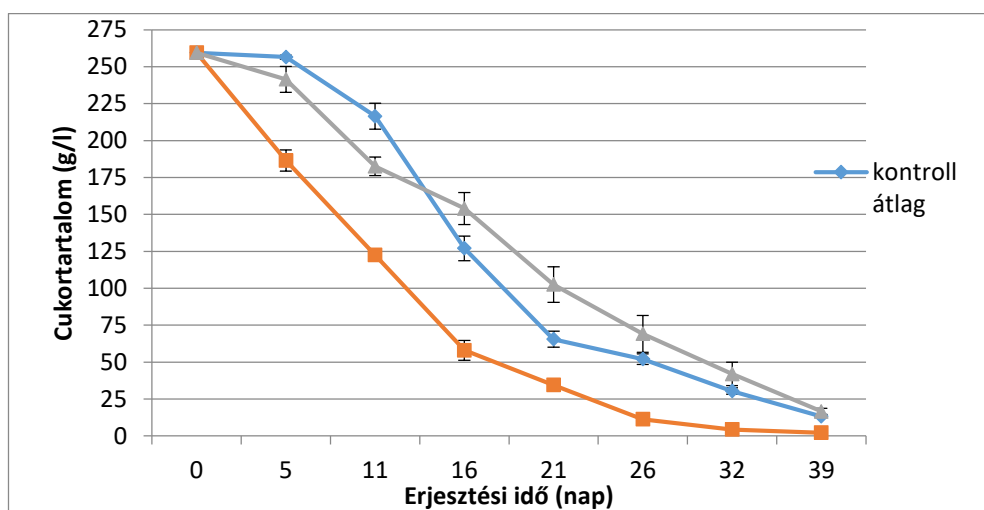
**14. táblázat:** A Tokaj törzsekkel erjesztett mikrovinifikációs borok összetétele az erjedés 30. napján

Törzsek	(g/l)							pH
	Etanol	Össz cukor	Fruktóz	Glükóz	Glicerín	Összes sav	Ecetsav	
10-1343 (T1)	126.0 <sup>a</sup>	3.30 <sup>a</sup>	3.10 <sup>b,c,d</sup>	0.00 <sup>a</sup>	7.05 <sup>a,b,c</sup>	7.70 <sup>d</sup>	0.45 <sup>b</sup>	3.05
10-1344 (T2)	126.0 <sup>a</sup>	3.85 <sup>a</sup>	2.95 <sup>b,c,d</sup>	0.70 <sup>a,b,c</sup>	6.50 <sup>a,b,c</sup>	7.30 <sup>b,c,d</sup>	0.55 <sup>b,c</sup>	3.04
10-1345 (T4)	128.5 <sup>a</sup>	3.35 <sup>a</sup>	2.35 <sup>a,b,c</sup>	0.70 <sup>a,b,c</sup>	7.35 <sup>a,b,c</sup>	7.30 <sup>b,c,d</sup>	0.50 <sup>b</sup>	3.01
10-1346 (T5)	127.5 <sup>a</sup>	2.65 <sup>a</sup>	2.20 <sup>a,b</sup>	0.20 <sup>a,b</sup>	6.90 <sup>a,b,c</sup>	7.00 <sup>a,b,c,d</sup>	0.45 <sup>b</sup>	3.07
10-1347 (T7)	128.5 <sup>a</sup>	2.40 <sup>a</sup>	1.60 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a,b,c</sup>	6.25 <sup>a,b,c</sup>	6.60 <sup>a,b,c</sup>	0.40 <sup>a,b</sup>	3.11
10-1348 (T8)	125.5 <sup>a</sup>	2.05 <sup>a</sup>	1.90 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	6.65 <sup>a,b,c</sup>	6.75 <sup>a,b,c,d</sup>	0.45 <sup>b</sup>	3.05
10-1349 (T9)	129.5 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a,b,c,d</sup>	0.95 <sup>b,c</sup>	6.15 <sup>a,b</sup>	6.55 <sup>a,b,c</sup>	0.25 <sup>a</sup>	3.06
10-1350 (T10)	128.5 <sup>a</sup>	3.85 <sup>a</sup>	3.15 <sup>b,c,d</sup>	0.35 <sup>a,b,c</sup>	6.85 <sup>a,b,c</sup>	6.50 <sup>a,b</sup>	0.45 <sup>b</sup>	3.05
10-1351 (T11)	122.0 <sup>a</sup>	4.10 <sup>a</sup>	3.85 <sup>d,e</sup>	0.15 <sup>a,b</sup>	6.50 <sup>a,b,c</sup>	7.15 <sup>a,b,c,d</sup>	0.40 <sup>a,b</sup>	2.96
10-1352 (T12)	127.0 <sup>a</sup>	3.20 <sup>a</sup>	2.80 <sup>a,b,c,d</sup>	0.35 <sup>a,b,c</sup>	6.05 <sup>a,b</sup>	7.10 <sup>a,b,c,d</sup>	0.39 <sup>a,b</sup>	2.94
10-1353 (T13)	126.5 <sup>a</sup>	3.70 <sup>a</sup>	2.95 <sup>b,c,d</sup>	0.70 <sup>a,b,c</sup>	6.75 <sup>a,b,c</sup>	7.25 <sup>b,c,d</sup>	0.45 <sup>b</sup>	2.98
10-1354 (T15)	124.5 <sup>a</sup>	2.90 <sup>a</sup>	1.95 <sup>a,b</sup>	0.85 <sup>a,b,c</sup>	5.90 <sup>a,b</sup>	6.00 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>	3.13
10-1355 (T18)	124.5 <sup>a</sup>	5.70 <sup>b</sup>	4.40 <sup>e</sup>	1.20 <sup>c,d,e</sup>	6.30 <sup>a,b,c</sup>	6.20 <sup>a</sup>	0.39 <sup>a,b</sup>	3.04
10-1356 (T19)	122.5 <sup>a</sup>	5.00 <sup>a,b</sup>	3.70 <sup>d,e</sup>	1.15 <sup>c,d</sup>	7.70 <sup>c,d</sup>	6.90 <sup>a,b,c,d</sup>	0.48 <sup>b</sup>	3.02
10-1357 (T21)	124.5 <sup>a</sup>	4.10 <sup>a</sup>	3.55 <sup>c,d,e</sup>	0.45 <sup>a,b,c</sup>	6.55 <sup>a,b,c</sup>	7.50 <sup>b,c,d</sup>	0.46 <sup>b</sup>	2.97
10-1358 (T22)	121.5 <sup>a</sup>	6.25 <sup>b</sup>	3.85 <sup>d,e</sup>	2.00 <sup>d</sup>	8.90 <sup>d</sup>	6.75 <sup>a,b,c,d</sup>	0.52 <sup>b,c</sup>	3.10
10-1359	119.0 <sup>a</sup>	2.65 <sup>a</sup>	2.25 <sup>a,b</sup>	0.35 <sup>a,b,c</sup>	7.40 <sup>a,b,c,d</sup>	7.00 <sup>a,b,c,d</sup>	0.69 <sup>b,c</sup>	3.06
Uvaferm 43	122.5 <sup>a</sup>	2.75 <sup>a</sup>	2,10 <sup>a,b</sup>	0.35 <sup>a,b,c</sup>	7,05 <sup>a,b,c</sup>	6,95 <sup>a,b,c,d</sup>	0.59 <sup>b</sup>	3.06
S288c	116.5 <sup>a</sup>	11.70 <sup>c</sup>	9.70 <sup>+</sup>	2.05 <sup>e</sup>	6.95 <sup>a,b,c</sup>	7.25 <sup>b,c,d</sup>	0.45 <sup>b</sup>	2.99
F	18.2***	16.3***	7.62*	4.18*	4.60*	5.41*	6.48*	4.3+

F: Az analitikai meghatározások megbízhatósága:  $+F_{0.1}=3.01$ ,  $*F_{0.05}=4.41$ ,  $**F_{0.01}=8.40$ ,  $***F_{0.001}=15.38$ . Az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek szignifikánsan az alábbi értékeknél  $P=5\%$  valószínűségi szint.  
A pH  $LSD_{0,05}$  értéke 0,08 volt, így az alkalmazott analitikai módszerrel a tételek között  $P=5\%$ -os valószínűségi szinten nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni.

A kész borok miőségi paramétereinek meghatározási megbízhatósága  $p=0,001$  és  $p=0,1$  között változott, ahol az etanol (E) és az összes cukor (TS) szintjét nagyobb pontossággal lehetett meghatározni ( $F_E=18,2 > F_{TS}=16,3 > F_{0,001}=15,38$ ). A pH kivételével ( $F_{0,05}=4,41 > F_{pH}=4,31 > F_{0,1}=3,01$ ) minden paramétert  $p=0,05$  szinten határoztunk meg. A mennyiség/idő vonalak korrelációs együtthatója egy esetet kivéve a 10-1353 (T13) törzsé 0,9053 ( $r^2=0,8169$ ) minden esetben 0,9675 fölött volt ( $r^2=0,9362$ ), ami azt jelenti, hogy a regresszió illeszkedése  $p<0,01$  szinten elfogadható.

Ezen eredmények alapján az újabb erjesztési kísérlethez kiválasztottuk a 10-1358 (T22) és a 10-1347 (T7) törzseket magasabb cukor tartalmú sárgamuskotály must (259,5 g/l cukor; 5 g/l sav; 3,69 pH) erjesztéséhez. A fermentációkat 1 liter térfogatban végeztük el két ismétlésben. Kontrollként az Uvaferm 43 kereskedelmi starterkultúrát használtuk. (7. ábra)



7. ábra: 10-1358 (T7) és a 10-1347 (T22) törzsek és a kontroll Uvaferm 43 törzs erjesztési dinamikája cukorfogyás alapján (n=2).

Mindhárom törzs szárazra kierjesztette a bort. A kontroll kereskedelmi starterkultúra kicsit lassabban indította be az erjedést, de 11 nap múlva fokozódott az aktivitása és gyorsabban erjesztett, mint a 10-1358 (T22) törzs. A 10-1358 (T22) végig egyenletesen erjesztett. A 10-1347-s (T7) dinamikusán és a legintenzívebben erjesztett végig. A kierjelt borok analitikai értékeit a 15. táblázat tartalmazza.

15. táblázat: A 10-1358 (T22) és a 10-1347 (T7) törzsekkel és a kontroll Uvaferm 43 törzssel erjesztett borok analitikai eredményei (n=2).

minta	alkohol tartalom	cukor tartalom	összes sav tartalom	illósav tartalom	pH
	v/v%	g/l	g/l	g/l	
must	0	259,5	5,0		3,69
Uvaferm 43	15,82± 0,02	1,50± 0,71	5,52± 0,11	0,45± 0,15	3,90± 0,00
10-1347 (T7)	16,01± 0,13	1,33± 0,04	5,49± 0,04	0,385± 0,06	3,90± 0,04
10-1358 (T22)	15,43± 0,11	2,53± 0,04	6,56± 0,00	0,85± 0,07	3,82± 0,00

A kierjelt borok alkoholtartalma magas. A 10-1347 (T7) törzssel erjesztett boré a legmagasabb, átlagosan 16,01v/v%. Ezt követte a kontroll (Uvaferm 43) törzssel erjesztett átlag 15,82v/v%, majd a 10-1358 (T22) -es törzssel erjesztett átlagosan 15,43v/v%. Ezek alapján is elmondható, hogy jó alkoholtoleranciával jellemezhetőek a törzsek. A borokban az illósav tartalom kevesebb volt, mint 1g/l (1,0 g/liter száraz borokban az illósav megengedett határértéke a magyar bortörvény szerint). A 10-1347 (T7) és a kereskedelmi

starterkultúra lendületesebben erjesztett, mint a 10-1358 (T22) törzs. Ebben az erjesztési kísérletben is alacsony habképződés jellemezte a törzseket. A borok analitikai paraméterei alapján a 10-1347-s (T7) törzsszel készült bor a jobb minőségű. Az érzékszervi bírálat során viszont mindegyik bort jó minőségűnek, harmonikusnak és finomnak értékelték. Azoknak a boroknak az ízvilágát, amelyek a Tokaji törzsekkel erjedtek sokkal inkább a borvidékre jellemzőbb karakterűnek értékelték, mint a kereskedelmi starterkultúrával erjedtetek. Eredményeink által leginkább a 10-1347-s (T7) törzs lehet alkalmas üzemi szintű borkészítéshez is. A hosszútávú törzsfenntartás során nem veszített borászati értékéből.

#### 5.1.5 A törzsek taxonómiája

Az adott kor technikai lehetőségei nem biztosították az izolálás időpontjában a pontos fajmeghatározást. A morfológiai és fiziológiai tesztek eredményére alapozva Soós és Ásvány (1950) az élesztőket a *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoidens* fajhoz sorolták, de ennek a tisztázásához további vizsgálatot javasoltak.

A törzsek ITS régióinak mérete GelAnalyzer szoftverrel elemezve kb. 880 bázispár, ami megfelel a szakirodalomban számos *Saccharomyces sp.*-nek tulajdonított ITS régió méretének (Guillamon és Mtsi., 1998; Esteve-Zarzoso és Mtsi., 1999.).

A D1/D2 domén régiójának mérete szintén azonos az összes törzs esetében, ami kb. 600 bázispár.

Az ITS és a 26S D1/D2 PCR termékeket a Microsynth laboratóriuma megszekvenálta. A szekvenciákat az INSDC (International Nucleotide

Sequene Database Collaboration: <https://www.insdc.org/>) adatbázisba feltöltöttük. A mintáinkhoz tartozó akkcessziós számokat a Mellékletek 1. táblázata tartalmazza. A kapott szekvenciák az NCBI adatbázis BLAST szolgáltatásával elemezve és az eredmények megerősítése végett a CBS adatbázisában megtalálható *Saccharomyces* típusörzsek szekvenciájával páronkénti összehasonlítást is végeztünk.

A nagy alegység D1/D2 doménjának a szekvenciája a legtöbb Tokaj törzsnél (I Típus) megegyezett a CBS 1171<sup>NT</sup> *S. cerevisiae* neotype törzsének a szekvenciájával és különbözött a *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus* és *S. uvarum* típusörzsek megfelelő szekvenciájától a 10, 7 és 11 pozíciókban egyaránt (8. ábra). Négy törzs (II típus) két pozícióban tért el a *S. cerevisiae* neotípus törzstől, és 12, 9 és 13 pozíciókban a másik három típusörzstől. A két eltérés a D1 régióban egy T-C szubsztitúció és D2 régióban egy T inszerció.

Az ITS1-5.8S-ITS2 szekvenciája az I típusú törzsek esetében nem egységes. Három törzs, a 10-1344 T2, 10-1346 T5 és a 10-1357 T21 szekvenciája nem tér el a *S. cerevisiae* neotípus törzstől. Egy pozícióban, az ITS 1 régióban a 10-1351 T11, 10-1352 T12 és a 10-1358 T22 tért el a *S. cerevisiae* neotípus törzstől. Két helyen a 10-1343 T1, 10-1350 T10, 10-1353 T13, 10-1354 T15 és a 10-1355 T18 tért el 1-1 pozícióban az ITS1 és az ITS2 régióban. Három helyen a 10-1356 T19 és a 10-1359 tért el az ITS1, 5.8S és az ITS2 régiókban. A többi *Saccharomyces* típusörzs szekvenciájától 19, 11 és 25 helyen tértek el ( a 9. ábra csak a *S. cerevisiae* típusörzs szekvenciájától eltérő helyeket mutatja). A II Típusú törzsek esetében az egyező különbségek 4, 23, 15 és 29 helyen voltak. (9. ábra). ITS1 régióban egy TT és C inzerció és egy G/T szubsztitúció, ITS2 régióban egy TT inzerció volt megfigyelhető.

Az rDNS-régiók magas szekvencia-hasonlósága a *S. cerevisiae* CBS 1171<sup>NT</sup>-hez képest azt jelenti, hogy a Tokaj-törzsek mindkét csoportja a *S. cerevisiae* fajhoz tartozik (Mellékletek 1. táblázat).

Összhangban ezzel az eredménnyel az összes Tokaj-törzs növekedett 35 °C-on, hasznosította a maltózt, galaktózt és a raffinózt szénforrásként, de nem tudták asszimilálni vagy fermentálni a mannitolt, mellibiózt és az inulint, mely jellemzőket rutinszerűen vizsgálják a *S. cerevisiae* elkülönítéséhez a többi három rokon fajtól (Antunovics és Mtsi., 2005; Vaughan-Martini és Martini, 2011).

#### *rDNS szekvencia diverzitása*

A II-típusú szekvenciák az I-típusú törzsek szekvenciáitól és a *S. cerevisiae* típus törzs szekvenciájától egy T-C szubsztitúcióban a D1 doménben és egy T inzercióban a D2 doménben térnek el (8. ábra). A GenBank adatbázisban végzett keresés mindösszesen 16 szekvenciát talált, amiben mind a két marker megtalálható volt (16. táblázat), ami azt jelzi, hogy ez a genotípus ritka a *S. cerevisiae*-k körében. Tizenhárom szekvenciát borászati élesztőkből amplifikáltak, amiket az alábbi földrajzi területekről izoláltak: Szlovákia (5), Spanyolország (5), Ausztria (1), Franciaország (1), és Ausztrália (1).

Az ITS1-5.8S-ITS2 szegmensben a II-típusú szekvenciák rendelkeztek egy TT és egy C inzercióval és egy G/T szubsztitúcióval az ITS1 régióban illetve egy TT inzercióval az ITS2 régióban. A G/T szubsztitúciót leszámítva ezek hiányoztak mind az I-típusú törzsekben, mind a *S. cerevisiae* CBS 1171<sup>NT</sup> típustörzsben (9. ábra). A markerek egyenként az adatbázis-szekvenciákban igen gyakran fordultak elő, de mindösszesen 11 szekvenciát

találtunk, amelyek mindháromat tartalmazzák. Egy kivételével minden szekvencia olyan törzsekből származott, amelyek mindegyik II-típusú markereket tartalmazták a D1/D2 szegmensben (16. táblázat). Három hártaképző élesztőt Jura-ban (Franciaország) izoláltak és egy törzset borból Liběchov-ben (Cseh Köztársaság), mindhárom tartalmazza a II-típusú markereket az ITS szekvenciájukban, viszont nem rendelkeztek elérhető D1/D2 szekvenciával az adatbázisban.

	<u>D1</u>	<u>D2</u>
Tokaj törzsek:		
Típus I		
10-1343 T1	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1344 T2	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1346 T5	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1350 T10	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1351 T11	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1352 T12	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1353 T13	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1354 T15	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1355 T18	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1356 T19	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1357 T21	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1358 T22	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
10-1359	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
Típus II		
10-1345 T4	GCCCTCGA	CCTGTTGGGA
10-1347 T7	GCCCTCGA	CCTGTTGGGA
10-1348 T8	GCCCTCGA	CCTGTTGGGA
10-1349 T9	GCCCTCGA	CCTGTTGGGA
	* * * * *	* * * * *

A fajok típustörzseinek szekvenciái:

<i>S. cerevisiae</i>	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA
<i>S. kudriavzevii</i>	GCCTTCGA	CCTGC-GGGA
<i>S. paradoxus</i>	GCCTTCGA	CCTGC-GGGA
<i>S. uvarum</i>	GCCTTCGA	CCTGC-GGGA

Példák *S. cerevisiae* törzsek adatbázis-szekvenciáira:

AJ544258	GCCCTCGA	CCTGT-GGGA
KY109417	GCCCTCGA	CCTGTTGGGA
KY816824	GCCCTCGA	CCTGTTGGGA
KY816875	GCCTTCGA	CCTGT-GGGA

8. ábra: Az rDNS-szekvenciák Clustal összerendezése. A D1/D2 domén variábilis helyeket tartalmazó szegmenseinek összerendezése. A típustörzsek akcessziós számai: AY497669 (*S. cerevisiae* CBS 1171NT), AB040995 (*S. kudriavzevii* CBS 8840T), AF005703 (*S. paradoxus* CBS 432NT) és AJ279065 (*S. uvarum* CBS 395T)

ITS1		5.8S	ITS2
Tokaj törzsek:			
Típus I			
10-1343 T1	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TTTAT
10-1344 T2	TTT -- GT...TCGTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TT -AT
10-1346 T5	TTT -- GT...TCGTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TT -AT
10-1350 T10	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TTTAT
10-1351 T11	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TT -AT
10-1352 T12	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TT -AT
10-1353 T13	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TTTAT
10-1354 T15	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TTTAT
10-1355 T18	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TTTAT
10-1356 T19	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TTTAT
10-1357 T21	TTT -- GT...TCGTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TT- AT
10-1358 T22	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT-- CC...TT- AT
10-1359	TTT -- GT...TCTTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT --CC...TTTAT
Típus II			
10-1345 T4	TTTTTGT...TCTTGCTAGGCCTT	AAA- TA	TTTTTCC...TT-AT
10-1347 T7	TTTTTGT...TCTTGCTAGGCCTT	AAA- TA	TTTTTCC...TT-AT
10-1348 T8	TTTTTGT...TCTTGCTAGGCCTT	AAA- TA	TTTTTCC...TT-AT
10-1349 T9	TTTTTGT...TCTTGCTAGGCCTT	AAA- TA	TTTTTCC...TT-AT

9. ábra: Az ITS1 és ITS2 belső átírt szekvenciák variábilis helyeket tartalmazó szegmenseinek összerendezése.

A fajok típustörzseinek szekvenciái:

<i>S. cerevisiae</i>	TTT--GT....TCG	GTGCTAGGC-TT	AAA- TA	TTT--CC....TT-A
<i>S. kudriavzevii</i>	TTT--GT....TCT	TGCTAGGC-TT	AAAATA	TTT--CC....TT-G
<i>S. paradoxus</i>	TTT--GT....TCT	TGCTAGGC-TT	AAAATA	TTT--CC....TT-G
<i>S. uvarum</i>	TTT--GT....TCT	TGCTAGGC-TT	AAAATA	TTT--CC....TT-G

Példák *S. cerevisiae* törzsek adatbázis-szekvenciáira:

KU131579	TTT -- GT....TCT	TGCTAGGC- TT	AAA-TA	TTT -- CC....TTTAT
KR535580	TTT -- GT....TCT	TGCTAGGC- TT	AAA-TA	TTTTTCC....TTTAT
AM262824	TTT -- GT....TCT	TGCTAGGCCTT	AAA-TA	TTTTTCC....TTTAT
KY105133	TTTTTGT....TCT	TGCTAGGCCTT	AAA-TA	TTTTTCC....TT- AT
KY105143	TTTTTGT....TCT	TGCTAGGCCTT	AAA-TA	TTTTTCC....TT- AT

A típustörzsek akcessziós számai: KY105073 (*S. cerevisiae* CBS 1171NT), FJ196779 (*S. kudriavzevii* CBS 8840T), AJ229059 (*S. paradoxus* CBS 432NT) and AY130306 (*S. uvarum* CBS 395T).

16. táblázat: A II. típusú Tokaj törzsek jellegzetes markereit tartalmazó adatbázis-szekvenciák listája.

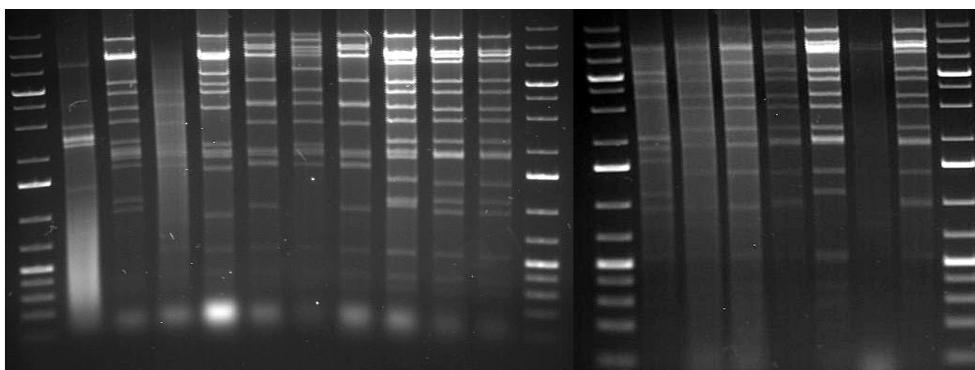
Törzs/klón	Aksesziós száma a		A törzs eredete	
	D1/D2 szekvenciáknak, amely mindkét markert tartalmazza <sup>a</sup>	ITS1-5.8S-ITS2 szekvenciáknak, amely mind a négy markert	Szubsztrát	Ország
ATCC 834	KU729158	KU729072	Tejsavó	USA
CBS 2183	KY109350	KY109350	Bor	Francia
CBS 2247	KY109262	KY105059	Gyümölcsle	Dél Africa
CBS 2789	KY109365	KY105114	Bor	Szlovákia-Magyar
CBS 2805	KY109366	KY105143	Bor	Szlovákia
CBS 2807 (YJM270)	KY109360	KY109360	Bor	Szlovákia
CBS 2808	n.e.	KY105138	Bor	Cseh Köztársaság
CBS 2814	CBS szekvencia	KY105135	Bor	Szlovákia
CBS 2963	KY109417	CBS szekvencia	Szeszfözde	Dánia
CBS 4054	KY109258	KY105036	Bor	Spanyol
CBS 4079	KY109340	n.d.	Bor	Spanyol
CBS 5835	KY109263	n.d.	Bor	Spanyol
CECT 11762	AJ544259	n.d.	Sherry	Spanyol
CECT 12664	AJ544261	n.d.	Sherry	Spanyol
HA1835	AM262822	AM262824	Bor	Ausztria
K-53-15-44	KY816824	n.e.	Jégbor	Szlovákia
K-53-15-45	KY816825	n.e.	Jégbor	Szlovákia
YJM1574 (AWRI1775)	CP006432	k.	Sherry	Ausztrália
CAV21	n.e.	FM177897	Bor, hártya	Francia
MAC51	n.e.	FM177898	Bor, hártya	Francia
LRJura	n.e.	FM177899	Bor, hártya	Francia

k.: különböző.      n.e.: nem elérhető.      n.d.: nagyon eltérő a nagy deléciók miatt.  
CBS szekvencia: szekvencia elérhető a CBS törzs adatbázisban:  
(<http://www.westerdijkinstituut.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database> ).  
<sup>a</sup> A markerek leírását lásd a 9. ábrán

### *A mitokondriális genom diverzitása*

A mitokondriális DNS restrikciós analízise a 17 Tokaj törzs esetében 13 különböző mintázatot eredményezett (10. ábra). A 10-1351 (T11) és a 10-1352 (T12) törzs mintázata azonos volt. Figyelemre méltó, hogy ez a két törzs azonos kariotípussal és mikroszatellit mintázattal rendelkezik, testvér ágat formálnak az interdelta dendrogramon és I-típusú rDNS mintázattal rendelkeznek. A 10-1347 (T7), 10-1349 (T9) szintén azonos mtDNS mintázattal rendelkeznek, de különbözik a kariotípusuk, interdelta és mikroszatellit mintázatuk viszont mindketőnek II-típusú rDNS-e van.

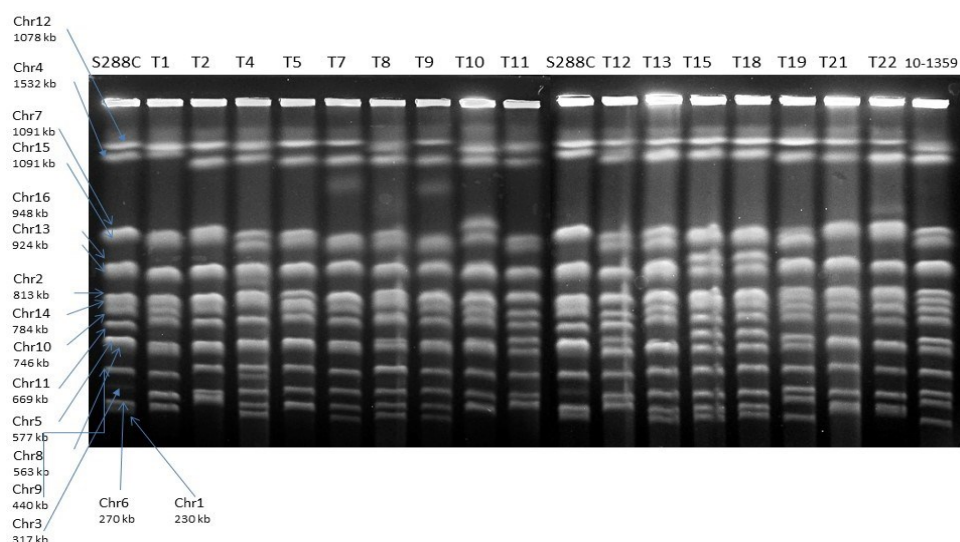
Az azonos mintázattal rendelkező törzsek között nincs összefüggés az izolálás földrajzi helyében, idejében és forrásában, sem fiziológiai tulajdonságaikban. A 10-1358 (T22) törzs mitokondriális DNS-ének emésztése számos próbálkozás ellenére sem eredményezett értékelhető mintázatot. Ennek oka eddig ismeretlen.



10. Ábra: a Tokaj törzsek mitokondriális DNS sávmintázata *EcoRV*-tel emésztve. Jelmagyarázat: 10-1343 (T1), 10-1344 (T2), 10-1345 (T4), 10-1346 (T5), 10-1347 (T7), 10-1348 (T8), 10-1349 (T9), 10-1350 (T10), 10-1351 (T11), 10-1352 (T12), 10-1353 (T13), 10-1354 (T15), 10-1355 (T18), 10-1356 (T19), 10-1357 (T21), 10-1358 (T22), 10-1359, M: 1kb DNS-marker.

## Kariotípus diverzitása

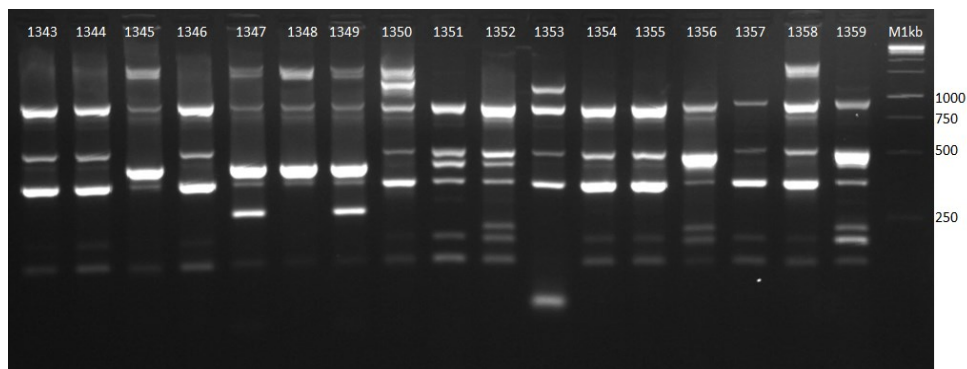
Tíz különböző kromoszóma mintázat volt megfigyelhető a Tokaji törzsek esetében (11. Ábra). A 10-1343 (T1), 10-1344 (T2), 10-1345 (T4), 10-1346 (T5) és a 10-1350 (T10) törzsek egyedi mintázattal rendelkeztek. A többi törzs hat csoportot alkotott. A maradék többi csoport mindegyike két törzsből állt: 10-1347 (T7)/ 10-1349 (T9), 10-1348 (T8)/ 10-1353(T13), 10-1351 (T11)/10-1352 (T12), 10-1354 (T15)/10-1355 (T18), 10-1356 (T19)/10-1359 és 10-1357 (T21)/10-1358 (T22). A törzspárosok tagjai különböző szubsztrátból, földrajzi helyről és évből származtak. Nyilvánvalóan nem volt összefüggés a kromoszóma mintázatok és a törzsek eredete között.



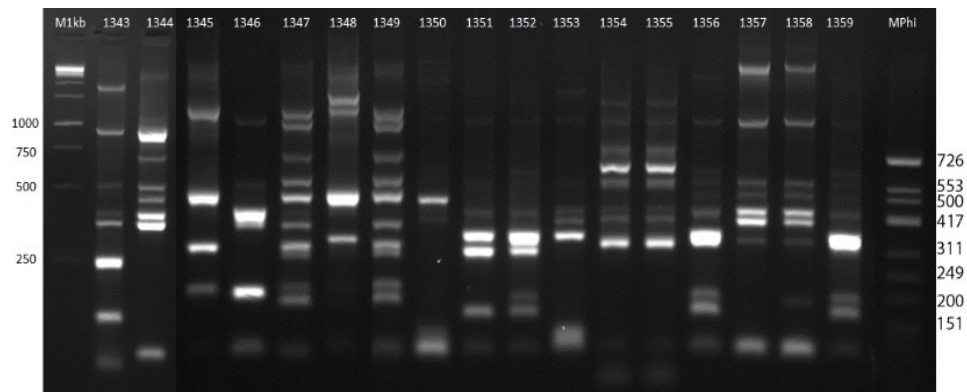
11. Ábra: A CHEF elektrokarogramja a törzseknek. Jelmagyarázat: 10-1343 (T1), 10-1344 (T2), 10-1345 (T4), 10-1346 (T5), 10-1347 (T7), 10-1348 (T8), 10-1349 (T9), 10-1350 (T10), 10-1351 (T11), 10-1352 (T12), 10-1353 (T13), 10-1354 (T15), 10-1355 (T18), 10-1356 (T19), 10-1357 (T21), 10-1358 (T22), 10-1359, S288C: 10-642

### *Interdelta, RAPD és mikroszatellita-alapú PCR (MSP) diverzitás*

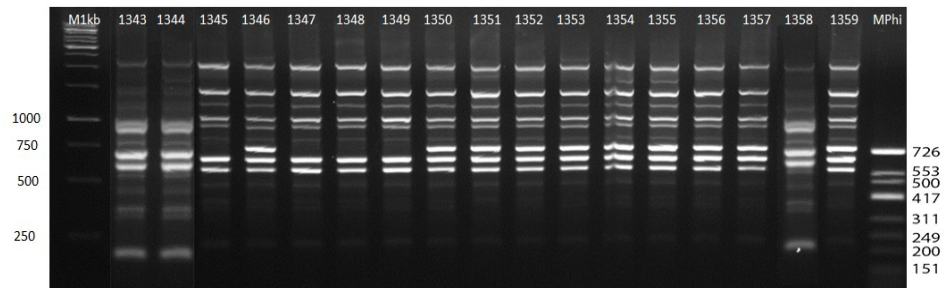
Az interdelta genotipizálás (12. és 13. ábra) alkalmasabbnak bizonyult a törzsek sokféleségének értékelésére mint az MSP és a RAPD (14., 15. és 16. ábra) mivel az esetek többségében lehetővé tette a törzsszintű felbontást. A kombinált (2 primerpár) delta ujjlenyomat elemzés esetében, csak két azonos törzspárat találtunk (10-1347 (T7) 10-1349 (T9) és 10-1354 (T15) 10-1355 (T18)).



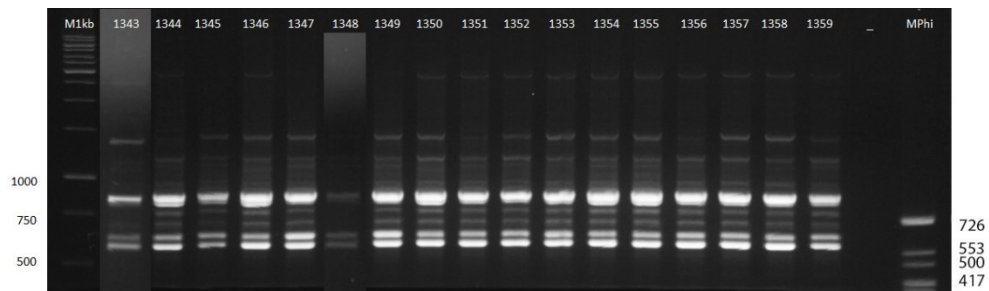
12. ábra: A törzsek interdelta (delta1-2) mintázata. Jelmagyarázat: 1343 (T1), 1344 (T2), 1345 (T4), 1346 (T5), 1347 (T7), 1348 (T8), 1349 (T9), 1350 (T10), 1351 (T11), 1352 (T12), 1353 (T13), 1354 (T15), 1355 (T18), 1356 (T19), 1357 (T21), 1358 (T22), 1359, M: 1kb DNS-marker.



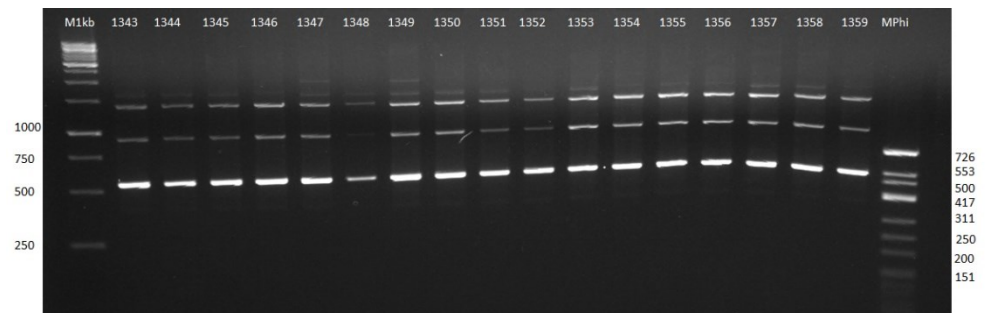
13. ábra: A törzsek interdelta (delta12-2) mintázata. Jelmagyarázat: 1343 (T1), 1344 (T2), 1345 (T4), 1346 (T5), 1347 (T7), 1348 (T8), 1349 (T9), 1350 (T10), 1351 (T11), 1352 (T12), 1353 (T13), 1354 (T15), 1355 (T18), 1356 (T19), 1357 (T21), 1358 (T22), 1359, M: 1kb DNS-marker. MPhi:  $\Phi$ X174 DNA/ HinfI marker



14. ábra: A törzsek MSP mintázata GTG<sub>5</sub> primer alkalmazásával. Jelmagyarázat: 1343 (T1), 1344 (T2), 1345 (T4), 1346 (T5), 1347 (T7), 1348 (T8), 1349 (T9), 1350 (T10), 1351 (T11), 1352 (T12), 1353 (T13), 1354 (T15), 1355 (T18), 1356 (T19), 1357 (T21), 1358 (T22), 1359, M: 1kb DNS-marker. MPhi:  $\Phi$ X174 DNA/ HinfI marker

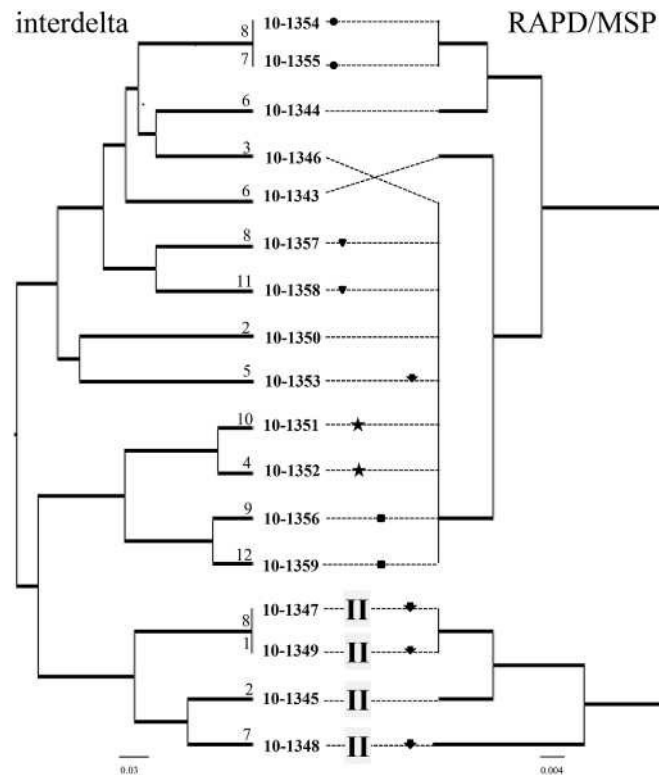


15. ábra: A törzsek RAPD mintázata RF2 primer alkalmazásával. Jelmagyarázat: 1343 (T1), 1344 (T2), 1345 (T4), 1346 (T5), 1347 (T7), 1348 (T8), 1349 (T9), 1350 (T10), 1351 (T11), 1352 (T12), 1353 (T13), 1354 (T15), 1355 (T18), 1356 (T19), 1357 (T21), 1358 (T22), 1359, M: 1kb DNS-marker. MPhi:  $\Phi$ X174 DNA/ HinfI marker



16. ábra: A törzsek RAPD mintázata 24 primer alkalmazásával. Jelmagyarázat: 1343 (T1), 1344 (T2), 1345 (T4), 1346 (T5), 1347 (T7), 1348 (T8), 1349 (T9), 1350 (T10), 1351 (T11), 1352 (T12), 1353 (T13), 1354 (T15), 1355 (T18), 1356 (T19), 1357 (T21), 1358 (T22), 1359, M: 1kb DNS-marker. MPhi:  $\Phi$ X174 DNA/ HinfI marker

A kombinált interdelta mintázatok sokkal jobb differenciálást tettek lehetővé a törzsek között, mint a kombinált RAPD/MSP mintázatok (17. ábra). Az UPGMA dendrogramok a 17. ábrán láthatók. Az interdelta genotipizálás sokkal részletesebb dendrogramot eredményezett (17. ábra). A II-típusú r DNS-sel rendelkező törzsek mindkét dendrogramon egy kompakt csoportot alkotnak. Egyik dendrogram sem felel meg teljesen a kromozómaminták közötti kapcsolatoknak.



17. Ábra.: A középpont-gyökeres interdelta és az MSP UPGMA dendrogramok összehasonlítása. II: II. típusú rDNS-mintázattal rendelkező törzsek. Az azonos szimbólumokkal jelölt törzsek azonos kariotípussal rendelkeznek. Számok az interdelta dendrogram ágain: az erjedés végén mért alkoholszintek (14. táblázat), a legmagasabb (1 = 129,5 g/l) és a legalacsonyabb (12 = 119,0 g/l) között számozva.

## 5.2 A multistarter fejlesztés eredményei

### 5.2.1 A törzsek fiziológiai tulajdonságai

A *C. zemplinina* értékes borászati tulajdonságokkal rendelkező nem *Saccharomyces* élesztő, amely a tokaji édes borok erjedése során általában kimutatható. A *C. zemplinina* törzsek borászati tulajdonságainak megismerése céljából a gyűjteményünkből kiválasztottunk 37 különböző földrajzi helyről és szubsztrátról izolált törzset. A tokaji édes borok erjesztése során az élesztőkre ható legkomolyabb szelekciós nyomás a mustok rendkívül magas cukortartalma, mely jelentős ozmotikus stresszként szűkíti az erjesztést teljesíteni képes élesztők számát. Ezért a szelekciónk során fontos szempontként értékeltük a törzsek ozmotoleranciáját. Ezen kívül a *C. zemplinina* törzsek számos borászati fontos tulajdonságát vizsgáltuk, hogy értékeljük fiziológiai változatosságukat és potenciális alkalmazhatóságukat a borászatban.

A vizsgálatokba bevontunk további öt Tokaji borvidékről izolált *S. uvarum* és tíz *S. cerevisiae* törzset. Az eredményeket a 17. táblázat mutatja be, ahol a törzseket az egyes tulajdonságok alapján biotípusokba soroltuk. A 18. táblázat tartalmazza a törzscsoportokra jellemző értékeket.

A *C. zemplinina* törzsek etanoltermelő képességének vizsgálatára tesztfermentációkat végeztünk. A táptalajban lévő 20% w/v-os glükózból csak egy törzs termelt viszonylag kis mennyiségű etanolt 20 napos 25°C-on történő erjesztés után (a 11-10 törzs 8,52v/v% -kal), míg a törzsek többsége képes volt 9,0v/v% feletti etanol termelésére. Ez utóbbi törzscsoport meglehetősen egyenletes volt, 10,4v/v% átlagos etanoltermeléssel (szórás 0,24). A 12°C-on végzett tesztfermentációkban az etanoltermelésben sokkal

nagyobbak voltak a különbségek (mindössze 3,7 és majdnem 10,3v/v% között), és 4 különböző biotípust lehetett megkülönböztetni.

A törzsek viszonylag kis változatosságot mutattak savtermelő profiljukban. Jelentős (0,3 g/l-nél nagyobb) almasavtermelés egyik törzsnél sem volt megfigyelhető, míg az ecetsavtermelés 1,3 és 2,9 g/l között mozgott a törzstől és a fermentáció hőmérsékletétől függően. A termelt ecetsav mennyisége 12°C-os fermentációs hőmérsékleten minden *C. zemplinina* törzsnél magasabb volt, és csak 2 biotípust különböztettünk meg az ecetsavtermelés alapján. A közeg összes titrálható savtartalma az erjesztés után szintén magasabbnak bizonyult az alacsonyabb vizsgálati hőmérsékleten, és a törzsek némileg nagyobb változatosságot mutattak e tulajdonság alapján, ami lehetővé tette 4 biotípus megkülönböztetését. A törzsek erjesztési teljesítményére a CO<sub>2</sub> ellilánásából származó tömegvesztéségből következtettünk. A törzsek többsége 25°C-on viszonylag gyors és erőteljes erjedést mutatott, a sorozatos mérésekkel kapott tömegvesztési görbék meglehetősen egyenletesek voltak. Az erjedés erőssége 12°C-on mérsékelten csökkent. A tömegvesztési görbék alapján 3 különböző biotípust lehetett megkülönböztetni. Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a *C. zemplinina* törzsek önmagukban nem képesek a borokat kiereszteni, de alkalmasak lehetnek kevert starterkultúrák alkotórészeként részt venni az erjesztésben.

17. táblázat: A törzsek fiziológiai tulajdonságai

Törzsek	Alkohol termelés		Össz savtermelés		Ecetsav termelés		Fermentációs erő		Ozmotolerancia	H <sub>2</sub> S termelés
	12 °C	25 °C	12 °C	25 °C	12 °C	25 °C	12 °C	25 °C		
10-372 C.z.	III	IV	III	I	II	I	II	II	IV	III
10-373 C.z.	II	IV	III	I	II	I	II	II	I	III
10-374 C.z.	III	IV	III	I	II	I	II	II	IV	III
10-375 C.z.	III	IV	III	I	II	I	II	II	I	III
10-376 C.z.	III	IV	III	I	II	I	II	II	IV	III
10-377 C.z.	III	IV	III	II	I	I	II	II	IV	III
10-622 C.z.	III	IV	III	I	II	I	III	II	IV	III
10-624 C.z.	III	IV	III	I	II	I	II	II	I	I
11-1 C.z.	II	IV	II	I	I	I	II	II	IV	III
11-4 C.z.	I	IV	III	III	II	II	I	II	IV	I
11-6 C.z.	III	IV	III	II	I	I	II	II	III	III
11-8 C.z.	III	IV	III	I	II	I	II	II	III	III
11-9 C.z.	IV	IV	III	I	II	I	III	II	III	III
11-10 C.z.	II	III	III	IV	II	I	II	I	II	II
11-18 C.z.	II	IV	III	II	II	I	II	III	IV	III
11-19 C.z.	III	IV	III	I	II	I	III	II	III	III
11-20 C.z.	II	IV	III	I	II	I	II	II	III	III
11-31 C.z.	IV	IV	III	I	II	I	III	II	III	III
11-60 C.z.	I	IV	II	II	II	I	I	II	II	II
11-75 C.z.	II	IV	II	I	II	I	II	II	II	III
11-88 C.z.	I	IV	III	II	II	I	I	II	IV	III
11-101 C.z.	II	IV	III	I	II	I	II	II	II	III
11-107 C.z.	II	IV	III	II	I	I	II	II	I	II
11-124 C.z.	II	IV	III	I	I	I	II	II	III	II
11-128 C.z.	II	IV	III	I	II	I	II	II	II	III
11-135 C.z.	III	IV	II	I	II	I	II	II	II	III

Törzsek	Alkohol termelés		Össz savtermelés		Ecetsav termelés		Fermentációs erő		Ozmotolerancia	H <sub>2</sub> S termelés
	12 °C	25 °C	12 °C	25 °C	12 °C	25 °C	12 °C	25 °C		
11-138 C.z.	IV	IV	II	I	II	I	III	II	II	III
11-144 C.z.	II	IV	III	I	I	I	II	II	I	II
11-148 C.z.	II	IV	III	I	I	I	II	II	II	II
11-149 C.z.	II	IV	III	I	I	I	III	II	I	III
11-150 C.z.	III	IV	III	I	II	I	II	II	II	II
11-152 C.z.	III	IV	III	II	II	I	II	II	II	III
11-159 C.z.	III	IV	III	II	II	I	II	II	II	III
11-479 C.z.	II	IV	II	II	I	I	II	II	I	III
11-659 C.z.	II	IV	III	I	II	I	II	II	II	III
10-5.11 C.z.	III	IV	III	II	I	I	II	II	II	I
II SE 12 C.z.	III	IV	III	II	II	I	II	II	III	I
10-403 S.c.	V	V	II	II	I	I	III	III	III	I
10-489 S.c.	V	V	II	II	I	I	III	III	III	I
10-492 S.c.	V	V	II	III	I	I	III	III	III	I
10-493 S.c.	V	V	II	III	I	I	II	III	III	I
10-496 S.c.	V	V	II	III	I	I	III	III	III	III
10-483 S.u.	V	V	II	II	I	I	III	III	III	III
10-484 S.u.	V	V	II	III	I	I	III	III	III	III
10-485 S.u.	V	V	II	III	I	I	III	III	III	III
10-486 S.u.	V	V	II	II	I	I	III	III	III	III
10-488 S.u.	V	V	II	II	I	I	II	III	III	III
10-491 S.u.	V	V	II	II	I	I	III	III	III	III
10-499 S.u.	V	V	II	II	I	I	III	III	III	III
10-501 S.u.	V	V	I	I	I	I	II	III	III	III
10-503 S.u.	V	V	II	I	I	I	III	III	III	III
10-505 S.u.	V	V	II	I	I	I	III	III	III	III

18. táblázat: A fiziológiai tulajdonságok alapján felállított biotípusok jellemzői

Fiziológiai jellemző	A biotípus leírása				
	I típus	II típus	III típus	IV típus	V.típus
Etanol termelés: v/v%	3-4.99	5-6.99	7-8.99	9-10.99	>11,0
Összes sav termelés: g/l	1-1.99	2-2.99	3-3.99	4-4.99	
Ecetsav termelés: g/l	1-1.99	2-2.99			
Fermentációs erő 12 °C	gyenge, elakadt	elhúzódó, mérsékelt	relatív gyors és erős		
Fermentációs erő 25 °C	gyenge, elakadt	mérsékeltten erős	erőteljes		
H <sub>2</sub> S termelés	Alacsony szulfátredukció, barna telepek	Közepes szulfátredukció, fekete telepek	Erős szulfátredukció, fekete telepek udvarral		
Ozmotolerancia	Növekedés 2% w/v glükóztartalom mellett.	Növekedés 20% w/v glükóztartalom mellett.	Növekedés 40% w/v glükóztartalom mellett.	Növekedés 60% w/v glükóztartalom mellett.	

A kísérletbe bevont *Saccharomyces* törzsekkel elvégeztük azokat a fiziológiás vizsgálatokat is, melyeket a *C. zemplinina* törzsekkel is elvégeztünk. Az eredmények alapján törzstípusokat hoztunk létre, melyekbe csoportosítani tudtuk a törzseket. Az eredmények a 17. táblázatban láthatók.

#### 5.2.2 A törzsek hatása a borok érzékszervi tulajdonságaira

A saját multistarter kultúránk fejlesztéséhez a Tokaji borvidékről izolált *C. zemplinina*, *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzsekkel próbaerjesztést is végeztünk sárgamuskotály mustban, hogy érzékszervi szempontok alapján is tudjuk értékelni a törzseket. A kiejedt borokat 20 pontos bírálati rendszer szerint organoleptikus elemzéssel értékeltük. A bírálatban négy fő vett részt. Az eredményt a 19. táblázat tartalmazza. Az eredmények alapján a *C. zemplinina* törzsek közül a 10-374-et, a *S. cerevisiae* törzsek közül a 10-489-et és a *S. uvarum* törzsek közül a 10-486-ot választottuk ki további vizsgálatokhoz.

19. táblázat: A próbaerjesztések érzékszervi bírálatának eredményei négy bíráló szerint 20 pontos rendszer alapján.

törzs	tisztaság 1-3	szín 1-3	illat 1-7	íz 1-7	összesen
10-372 C.z.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,25±1,26	2,75±1,26	13,00±0,82
10-374 C.z.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,50±1,29	4,25±1,26	14,75±1,71
10-377 C.z.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,50±1,29	3,00±2,00	13,50±2,65
10-5.11 C.z.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,50±1,00	4,00±1,15	14,50±1,91
II SE 12 C.z.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,00±1,83	4,75±1,50	14,75±1,91
10-403 S.c.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,50±2,38	3,00±2,16	13,50±4,12
10-489 S.c.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,50±1,29	4,50±0,58	15,00±1,26
10-492 S.c.	3,00±0,00	3,00±0,00	3,75±0,50	3,50±1,29	13,25±1,50
10-493 S.c.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,00±0,82	4,75±1,26	14,75±1,26
10-496 S.c.	3,00±0,00	3,00±0,00	3,00±0,82	4,75±1,50	13,75±1,71
10-483 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,75±0,50	2,75±1,89	13,50±1,73
10-484 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	3,50±1,00	2,50±1,73	12,00±2,45
10-485 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,00±1,41	3,00±1,83	13,00±2,45
10-486 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,50±1,29	4,75±0,96	15,25±2,06
10-488 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,00±0,82	3,50±1,29	13,50±1,91
10-491 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,75±1,26	3,25±2,22	14,00±3,16
10-499 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,75±0,50	4,25±1,50	15,00±1,83
10-501 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,75±1,71	4,25±1,71	15,00±3,16
10-503 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,00±1,41	2,75±0,96	12,75±2,06
10-505 S.u.	3,00±0,00	3,00±0,00	4,00±1,15	3,00±1,41	13,00±0,82

### 5.2.3 A törzsek killer aktivitása és szenzitivitása

A 19. táblázatban szereplő törzsek killer aktivitását 11-184 szenzitív törzs pázsitján vizsgáltuk. Kontrollként a 11-182 K2 killer aktív és a 11-183 K1 killer aktív törzseket használtuk. Killer aktivitást és szenzitivitást egyetlen *S. cerevisiae* és *S. uvarum* esetében sem tapasztaltunk.

A *C. zemplinina* törzsek közül egyedül a 10-5.11-es törzs mutatott szenzitivitást a 11-183 törzs K1 toxinjával szemben.

#### 5.2.4 A *Candida zemplinina* versenyképessége

Az eredményeink alapján a további vizsgálatokhoz kiválasztottuk a 10-374 *C. zemplinina*, a 10-489 *S. cerevisiae* és a 10-486 *S. uvarum* törzseket. A kiválasztás során súlyozottan vettük figyelembe a próbaerjesztések érzékszervi bírálati eredményét. Kísérletet állítottunk be annak érdekében, hogy megismerjük miként konkurálnak egymással kevert tenyészetben a törzsek különböző arányokban összekeverve. A fő kérdés, amit tisztázni szerettünk volna az volt, hogy a *C. zemplinina*-t kiszorítja-e a két jó erjesztőképességű *Saccharomyces* faj. A leoltásokban a törzsek arányát 9, 25, 49, 97, 145 és 245 óra után állapítottuk meg. A 9 és 245 órás eredmények grafikus ábrázolását a melléklet tartalmazza. A kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a YPGL tápfolyadékban az 1:1 arányú beoltások esetében a *C. zemplinina* aránya csak a *S. uvarum*-mal szemben csökkent 47%-ról 23%-ra. Ha az arányok 1:2 és 1:4 volt beállítva a *C. zemplinina* rovására, akkor sem tudták a *Saccharomyces* fajok teljesen kiszorítani. A *Saccharomyces*-ek közül mindig a *S. uvarum* tudott jobban túlszaporodni. Ha a *C. zemplinina* törzset helyeztük előnybe 2:1 és 4:1 arányban akkor sem tudott a *Saccharomyces*-eken túlnőni, de mértéke kevésbé csökkent.

Amikor 20% w/v és 40% w/v-ra egészítettük ki a tápfolyadék glükóztartalmát, akkor a *C. zemplinina* versenyképessége érzékelhetően lecsökkent. 40% w/v glükóztartalom esetén az 1:1 arányú leoltáskor a *S. cerevisiae*-vel szemben a kezdeti 53% után 245 óra múlva 31%-ra csökkent az aránya. *S. uvarum* esetén ez az érték 49%-ról 12%-ra csökkent. Viszont a leghátrányosabb 1:4 arányú leoltások esetében sem csökkent a *C. zemplinina* szintje 10% alá. A leghatékonyabb szelekciós tényezőnek a 8 v/v%

alkoholtartalom bizonyult. Minden beoltás, még a 4:1-hez előnyös körülmény esetében is drasztikusan csökkent a *C. zemplinina* aránya, de a legkedvezőtlenebb 1:4 –es arány esetében sem csökkent a mennyiségük 5% alá (Melléklet 2. ábra).

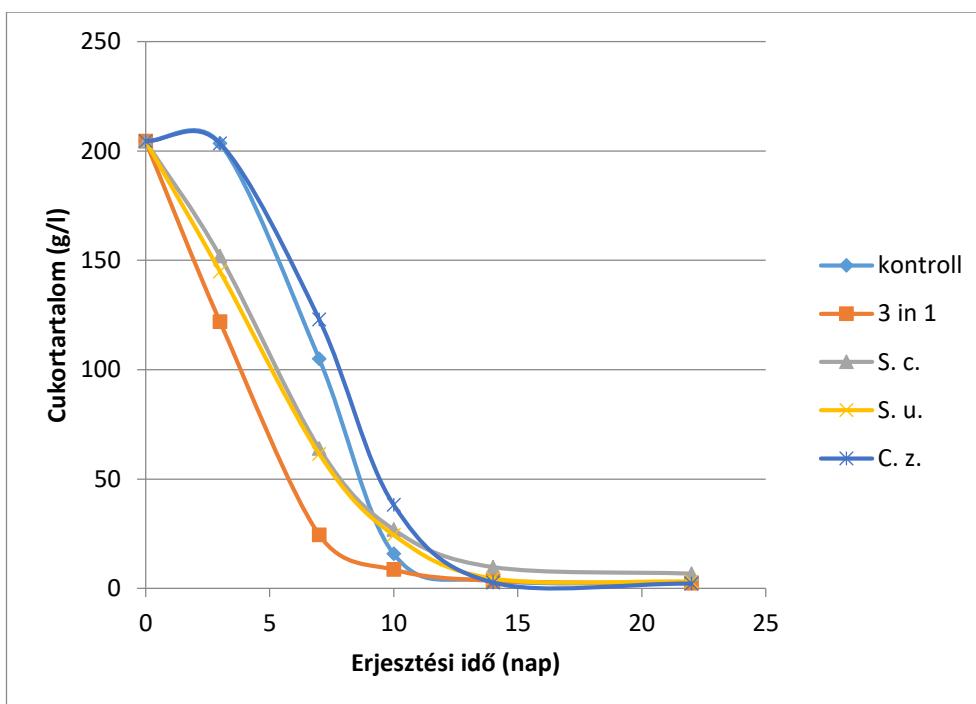
Ezek az eredmények biztatóak abból a szempontból, hogy valós borászati beoltás esetén valószínűleg napokig életképesek maradhatnak az általunk beoltott *C. zemplinina* élesztők, így hozzájárulhatnak a borok aromakomplexitásához.

### 5.2.5 A félézemi erjesztési kísérletek eredményei

2010-ben a Tokaj Kereskedőház Zrt. pincészetében állítottunk be erjesztési kísérletet. A mustunk furmint szőlőből készült. A kezdeti cukortartalma 204,5g/l, savtartalma 11,7 g/l volt. A must egy alap kénezést kapott, melynek hatására 6 mg/l lett a szabad és 50 mg/l az összes kén szintje. Kontrollként az egyik tételt nem oltottuk be, azt hagytuk spontán kiejedni. Készítettünk három beállítást, melyeket a 10-374 *C. zemplinina*, 10-489 *S. cerevisiae* és a 10-486 *S. uvarum* tenyészetével oltottunk be. Illetve egyet a három faj keverékével (3in1) inokuláltunk. Az erjedést analitikai és mikrobiológiai szempontból figyelemmel kísértük. A 20. táblázat mutatja az analitikai eredményeinket.

Az erjedés 3. napján a legintenzívebben a 3 fajt tartalmazó multistarter kultúrával beoltott must erjedt 4,33 v/v% alkoholtartalmat elérve. A leggyengébben a spontán erjedő kontroll tétel (0,26 v/v%) és a *C. zemplinina*-val beoltott (0,3 v/v%) erjedt. A kevert starterrel beoltott tétel lehet azért erjedt olyan jól, mert a két glükofil *S. cerevisiae* mellett a *C. zemplinina*

fruktofil tulajdonságú. Az erjedés 7. napján a multistarterrel beoltott must alkoholtartalma meghaladta a 10,0 v/v%-ot. A két *Saccharomyces* által erjesztett tétel fej-fej mellett 7,97 és 8,03 v/v% alkohol tartalommal haladt az erjedésben. A spontán erjedő tételben 5,57 v/v%, míg a *C. zemplinina*-val beoltott mustban csak 4,57 v/v% alkohol volt. A 10. napra az erjedés elkezdett lelassulni a különbségek kezdtek kiegyenlítődni. A legmagasabb alkoholtartalom ebben a fázisban is a kevert tenyészetes beoltásban volt mérhető (11,19 v/v%) és a legalacsonyabb a *C. zemplinina*-val erjedő tételben (9,34 v/v%). A 15. napon a különbség a tételek között az alkoholtartalom tekintetében mindössze 0,36 v/v% volt. Az erjedést minden tétel esetében 22 nap után befejezettek tekintettünk. Az erjedések dinamikája jónak volt mondható, nem volt elhúzódó. A legdinamikusabb lefutással a multistarter kultúrával beoltott tétel jellemezhető (18. ábra).



18. ábra: A 2010-es erjesztési kísérletek dinamikája a cukortartalom csökkenése alapján. 3 in 1: 10-374+10-486+10-489; S.c.:10-489; S.u.: 10-486; C.z.:10-374.

20. táblázat: 2010-es erjesztési kísérlet analitikai eredményei (n=1).  
C.z.: *C. zemplinia* 10-374; S.c.: *S. cerevisiae* 10-489; S.u.: *S. uvarum* 10-486;  
3 in 1: *C. zemplinia* 10-374+*S. cerevisiae* 10-489+*S. uvarum* 10-486

Minta	Nap	Alkohol tart. v/v%	Cukor tart. g/l	Sav tart. g/l	Illósav tart. g/l	Extrakt tart. g/l
Must		0,0	204,5	11,7	0,25	
Spontán	3.	0,26	203,5	13,2	0,32	
3 in 1		4,33	122	11,3	0,33	
S.c.		2,61	152	11,5	0,51	
S.u.		3,21	145,5	11,1	0,34	
C.z.		0,3	203,5	10,9	0,34	
Spontán	7.	5,57	105	12,4	0,34	
3 in 1		10,02	24,5	11,1	0,36	
S.c.		7,97	64	11,1	0,52	
S.u.		8,03	61,5	10,7	0,36	
C.z.		4,57	123	11,3	0,33	
Spontán	10.	10,75	15,9	11,3	0,27	
3 in 1		11,19	8,6	10,8	0,30	
S.c.		10,11	26,9	10,7	0,54	
S.u.		10,06	24,4	10,6	0,25	
C.z.		9,34	38,2	11,0	0,27	
Spontán	15.	11,7	3,6	10,8	0,25	
3 in 1		11,49	3,5	10,4	0,28	
S.c.		11,34	9,7	10,6	0,43	
S.u.		11,5	4,5	10,3	0,21	
C.z.		11,7	2,7	10,6	0,24	
Spontán	22.	11,83	2,6	10,5	0,27	30,21
3 in 1		11,63	2,3	10,3	0,26	29,52
S.c.		11,60	6,7	10,3	0,41	27,7
S.u.		11,75	3,1	10,0	0,27	28,5
C.z.		11,79	2,2	10,3	0,26	28,7

A borok organoleptikus értékelése során az alábbi rangsort és szöveges jellemzést adták a bírálók a borokra:

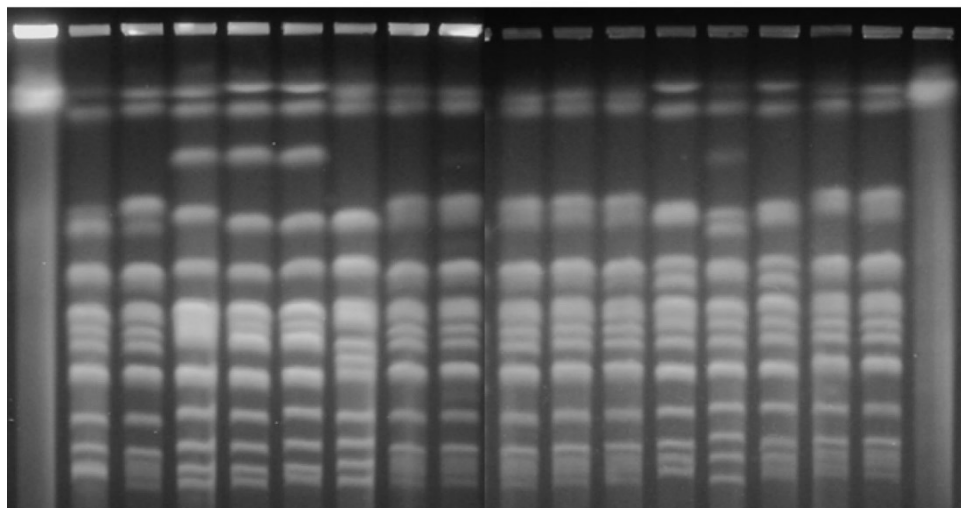
1. 3 in 1: komplex, gyümölcsös íz, illat intenzív, harmónikus sav
2. *Saccharomyces uvarum*: Komplex, gyümölcsös, tartós, kerek íz
3. *Saccharomyces cerevisiae*: sav hangsúlyos, gyors lecsengés
4. Spontán: sav hangsúlyos, gyors lecsengés, kicsit üres
5. *Candida zemplinina*: vékony, rövid, nem teljesen tiszta íz

Az erjedés során mikrobiológiai vizsgálatokhoz is vettünk mintákat. Célunk volt, hogy molekuláris markerekkel beazonosítsuk és megkülönböztessük az általunk beoltott *S. cerevisiae*, *S. uvarum* és *C. zemplinina* törzseket az erjedés során jelenlévő vad törzsektől, ezáltal bizonyítsuk, hogy valóban az általunk beoltott törzsek végezték az erjedést. Az izolált törzsekből konvencionális módszerekkel, asszimilációs tesztekkel választottuk ki a *S. cerevisiae* és a *S. uvarum* gyanús törzseket, melyekkel kariotipizálást és RAPD 1283 elemzést végeztünk el. A spontán erjedő kontroll tételből nem izoláltunk *C. zemplinina* törzset, így nem volt vad genotípusunk, amihez hasonlíthattuk volna az általunk beoltott starter törzseket. Az asszimilációs tesztekhez az alábbi szénforrásokat használtuk fel: galaktóz, maltóz, cellobióz, mellibióz, rafinóz, mannit, glicerin és lizin.

## Az erjedés során visszaizolált starterkultúra gyanús törzsek genotipizálása

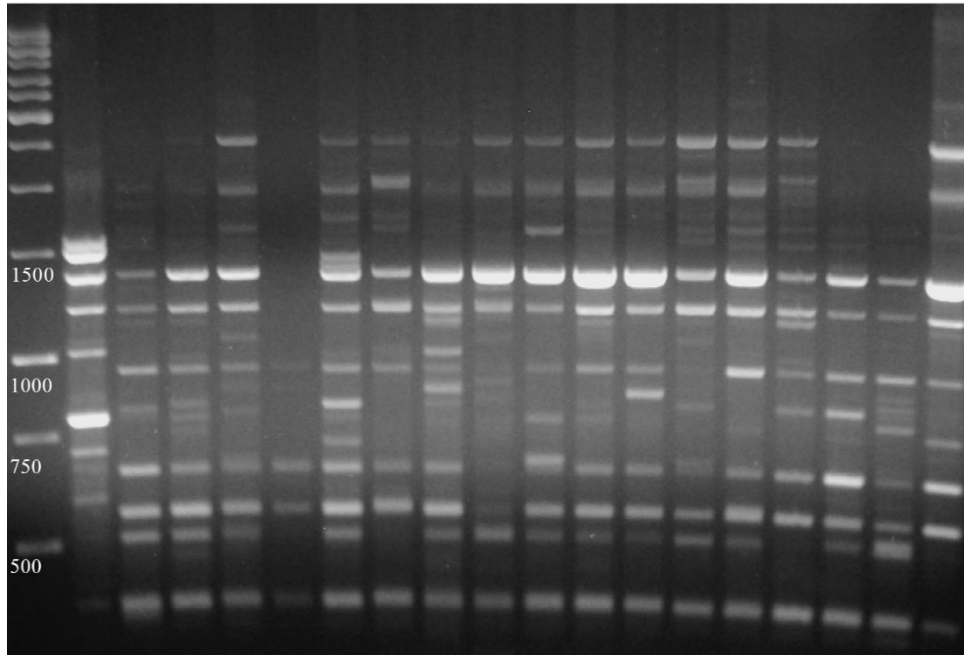
A spontán erjedő kontroll tételből asszimilációs tesztek alapján 18 db (16, 39, 55, 58, 67, 69, 70, 83, 86, 92, 93, 139, 143, 147, 163, 167, 168, 174) reprezentatív *S. cerevisiae* gyanús törzset választottunk ki CHEF és RAPD 1283 elemzésre, amiket vad törzseknek tekintettünk. A kariotipizálás eredménye alapján hétféle (A/B/C/D/E/F/G) kariotípust tudtunk elkülöníteni a vad *S. cerevisiae*-k között, illetve két izolátum (16, 174) nem-*Saccharomyces*-nek bizonyultak a kariotípusuk alapján (19. ábra). A RADP 1283 vizsgálat alapján még nagyobb a törzsek között a változatosság a hét kariotípuson belül is (20. ábra).

16 39 55 58 67 69 70 83 86 92 93 139 143 147 163 167 168 174  
NS A B C C C D B B B B B E F E G G NS



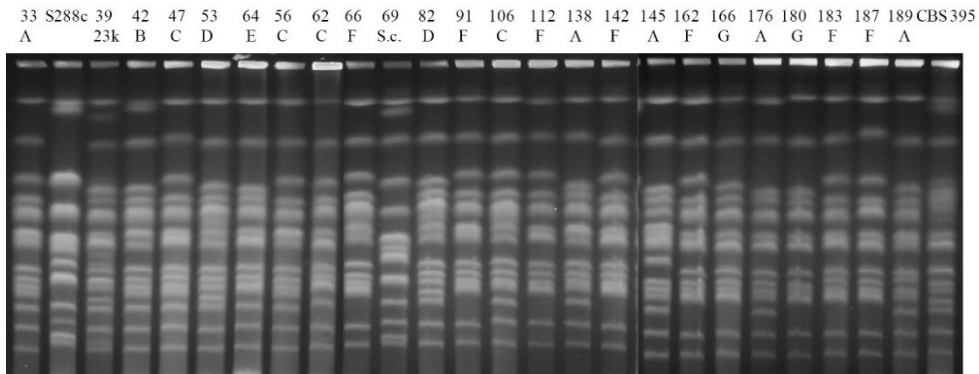
19. Ábra: A spontán erjedő kontroll tételből izolált vad *S. cerevisiae* törzsek kariotípusai. A-G: eltérő kariotípusok, NS: nem-*Saccharomyces* mintázat.

M 16 39 55 58 67 69 70 83 86 92 93 139 143 147 163 167 168 S288c  
 1Kb NC A B C C C D B B B B E F E G G



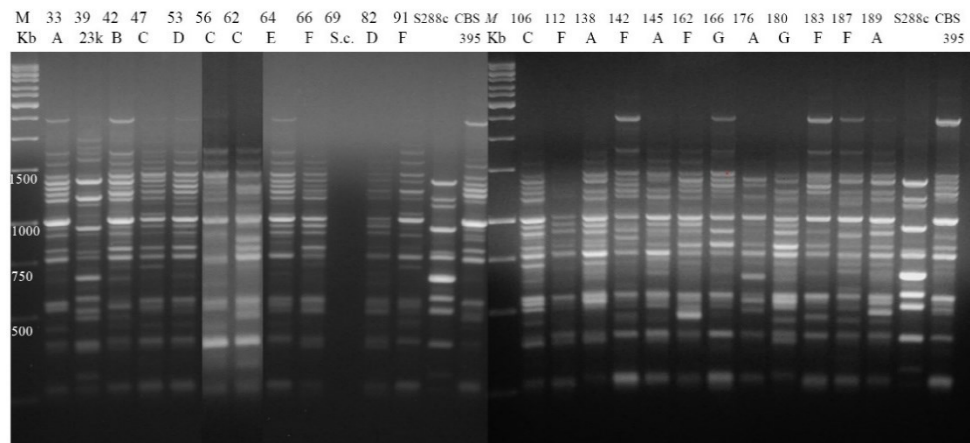
20. Ábra: A spontán erjedő kontroll tételből izolált vad *S. cerevisiae* törzsek RAPD 1283 analízise. A-G: eltérő kariotípus mintázat, NS: nem-*Saccharomyces* mintázat, M 1kb marker

Az asszimilációs tesztek alapján *S. uvarum* gyanús törzseket (33, 39, 42, 47, 53, 64, 56, 62, 66, 69, 82, 91, 106, 112, 138, 142, 145, 162, 166, 176, 180, 183, 187, 189) is megvizsgáltuk. A CHEF alapján 7 féle *S. uvarum*-ra jellemző kariotípust tudtunk megkülönböztetni (A-F). Egyes típusok látványosan eltértek a fajra jellemző kariotípustól, ami arra utal, hogy ezek nem is voltak *S. uvarum* törzsek (39, 69). Ebből az is következik, hogy a fiziológiai tesztek alapján nem lehet biztonsággal elkülöníteni a *S. uvarum* és a *S. cerevisiae* törzseket. (21. ábra).



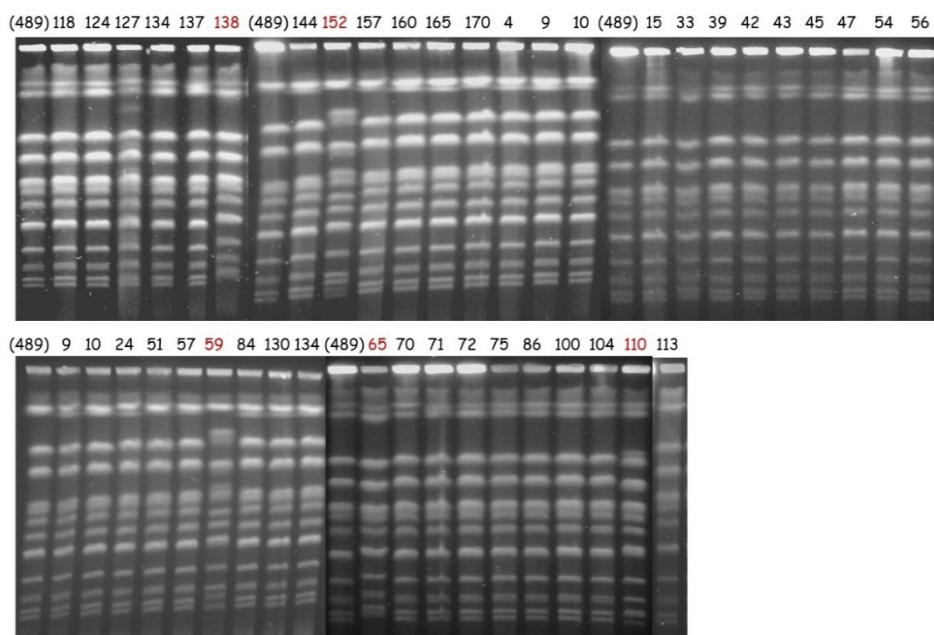
21. Ábra: A spontán erjedő kontroll tételből izolált vad *S. uvarum* gyanus törzsek kariotípusai. A-F: eltérő kariotípus mintázatok. 23k: nem *S. uvarum* mintázat, körülbelül 23 kromoszóma. S.c.: *S. cerevisiae* mintázat

A 22. ábrán a vad *S. uvarum* gyanus törzsek RAPD 1283 analízise látható. A betűkkel a kariotípusokat jelöltük. A kariotipizálás és a RAPD módszer a *S. uvarum* gyanus törzsek esetében sem adott azonos eredményt, azonos kariotípussal rendelkező törzsek RAPD mintázata eltérhet.



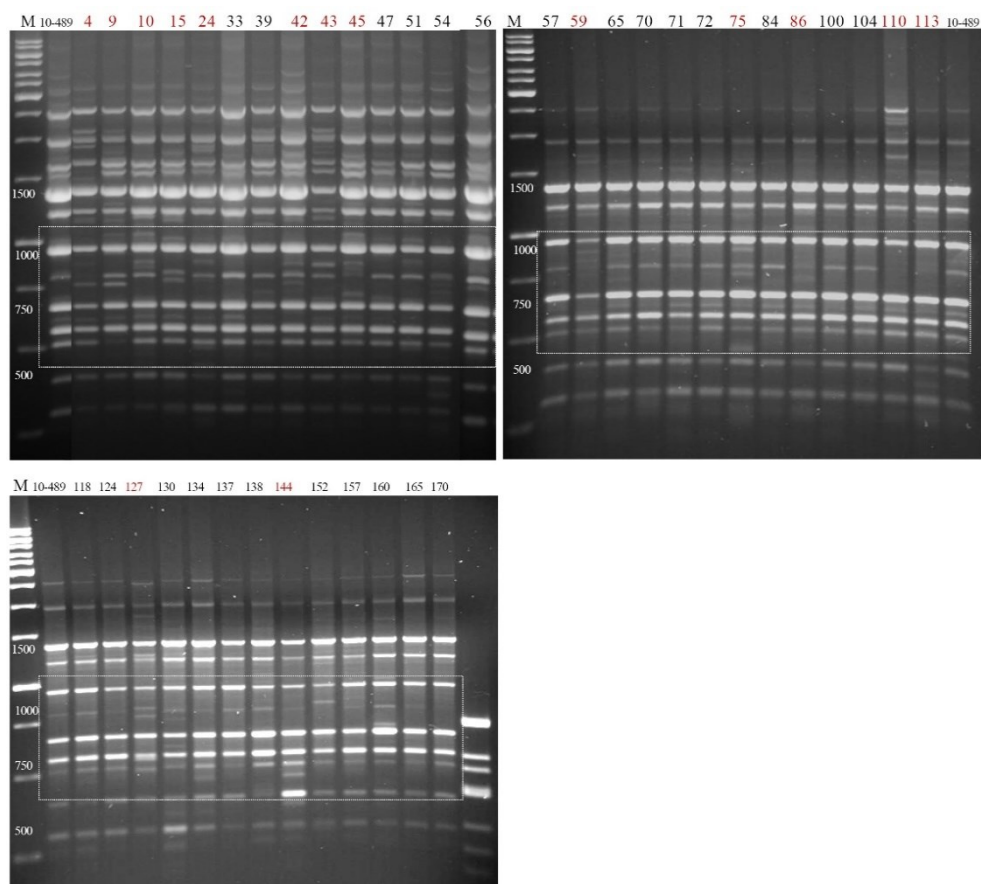
22. Ábra: A spontán erjedő kontroll tételből izolált vad *S. uvarum* törzsek RAPD 1283 mintázatai. A-F: eltérő kariotípus mintázatok. 23k: nem *S. uvarum* mintázat, körülbelül 23 kromoszóma. S.c.: *S. cerevisiae* mintázat

A multistarter kultúránkkal beoltott erjedésből izolált törzsekkel is elvégeztük a vizsgálatot, hogy megállapíthassuk, hogy a saját törzseink végezték-e a fermentációt. Az asszimilációs tesztek alapján 41 *S. cerevisiae* törzset választottunk ki (118, 124, 127, 134, 137, 138, 144, 152, 157, 160, 165, 170, 4, 9, 10, 15, 33, 39, 42, 43, 45, 47, 54, 56, 24, 51, 57, 59, 84, 130, 134, 65, 70, 71, 72, 75, 86, 100, 104, 110, 113). A starterkultúránk *S. cerevisiae* tagja a 10-489 törzs, ezért hozzá hasonlítottuk a mintázatokat. A tőle eltérő kariotípusú izolátumokat tekintettük vad *S. cerevisiae*-nek (23. ábra).



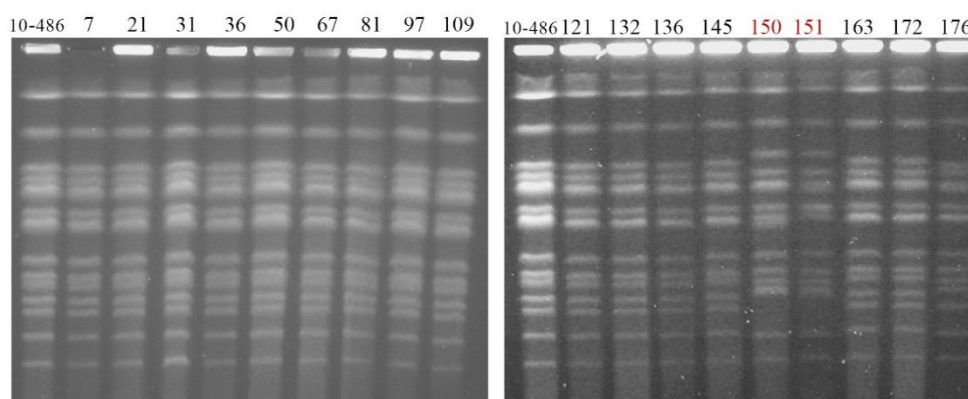
23. Ábra: A multistarter kultúrával beoltott tétel *S. cerevisiae* gyanús izolátumainak kariotípusai. Pirossal jelölve a feltételezhetően vad *S. cerevisiae* törzsek. (489): 10-489 általunk beoltott *S. cerevisiae* törzs

A 10-489-től kariogramon detektálható eltérés az 59, 65, 110, 138, 152 izolátumok esetén figyelhető meg. Nagyon valószínű, hogy ezek vad *S. cerevisiae* törzsek. A RAPD 1283 analízis során a törzsek mintázatbeli eltérése igen kicsi a 10-489-hez képest. A 4, 9, 10, 15, 24, 42, 43, 45, 59, 75, 86, 110, 113, 127, 152-es izolátumok mintázata bizonyult eltérőnek. A kariogrammal összevetve az 59-es és a 110-es izolátum tért el mindkét módszerrel az általunk beoltott *S. cerevisiae*-től (24. ábra).



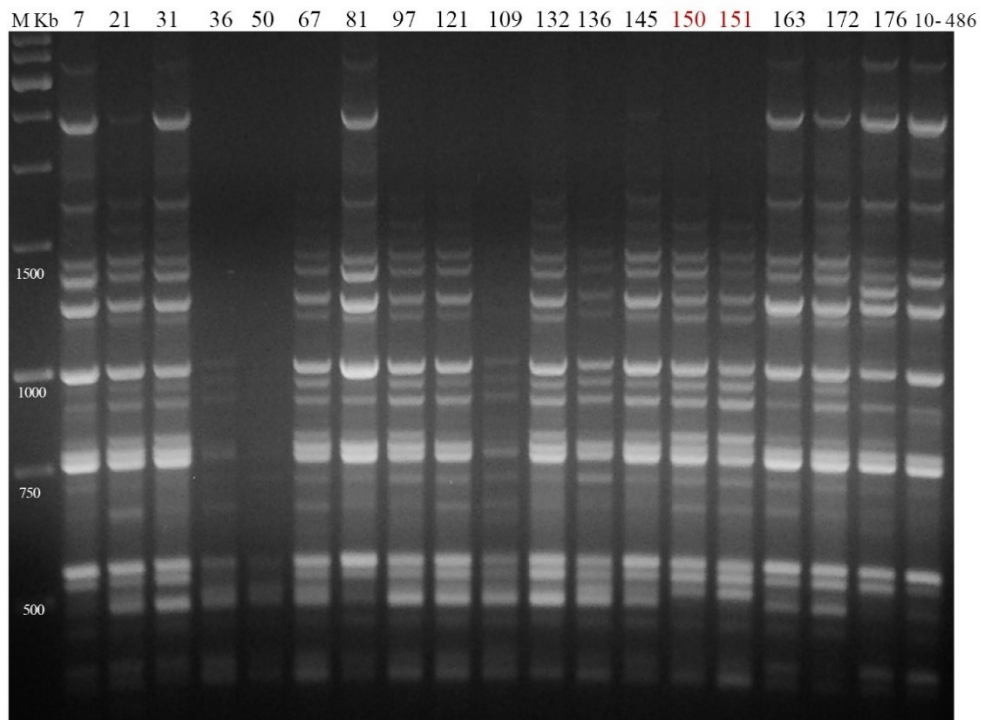
24. ábra: A multistarter kultúrával beoltott tétel *S. cerevisiae* gyanús izolátumainak RAPD 1283 mintázatai. Pirossal jelölve az eltérő mintázattal rendelkező törzsek. 10-489 általunk beoltott *S. cerevisiae* törzs

A multistarter kultúrával beoltott erjedésből az asszimilációs tesztek eredményei által 18 *S. uvarum* gyanús törzset izoláltunk (7, 21, 31, 36, 50, 67, 81, 97, 109, 121, 132, 136, 145, 150, 151, 163, 172, 176). Kariotípus tekintetében csupán két izolátum: 150 és 151 mintázata tér el a beoltott 10-486-étől. Ezek nagyon valószínű, hogy vad *S. uvarum*ok (25. ábra).



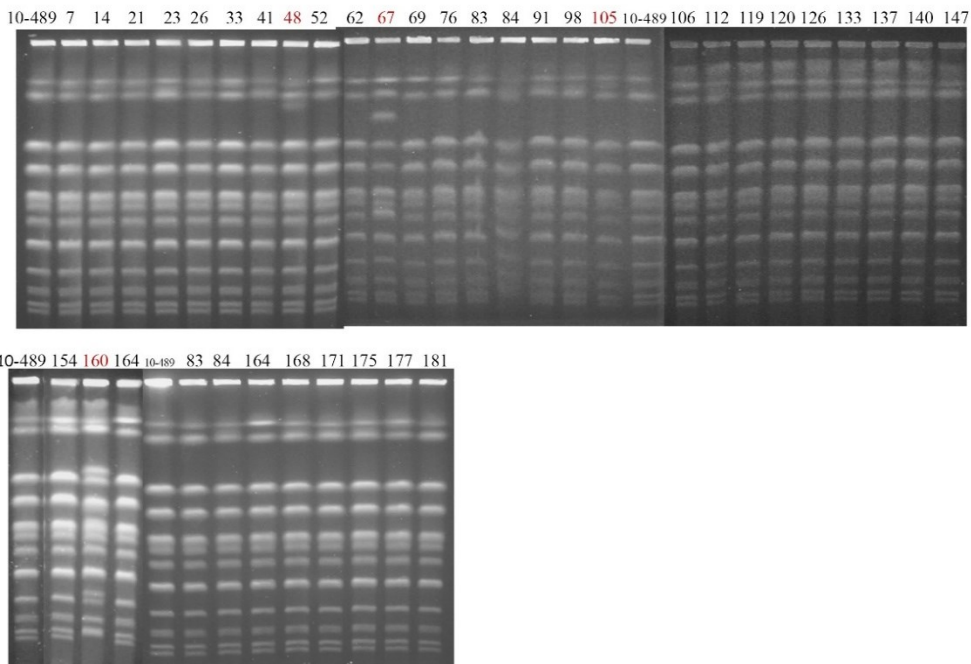
25. Ábra: A multistarter kultúrával beoltott tétel *S. uvarum* gyanús izolátumainak kariotípusai. Pirossal jelölve a feltételezhetően vad *S. uvarum* törzsek. 10-486 általunk beoltott *S. uvarum* törzs kariotípus mintázata.

A 150 és 151 izolátumok RAPD 1283 PCR elemzés alapján nem mutatnak különösebb eltérést a többi, kariotípus elemzés alapján a beoltott *S. uvarum*-unkkal egyező izolátumoktól (26. ábra).



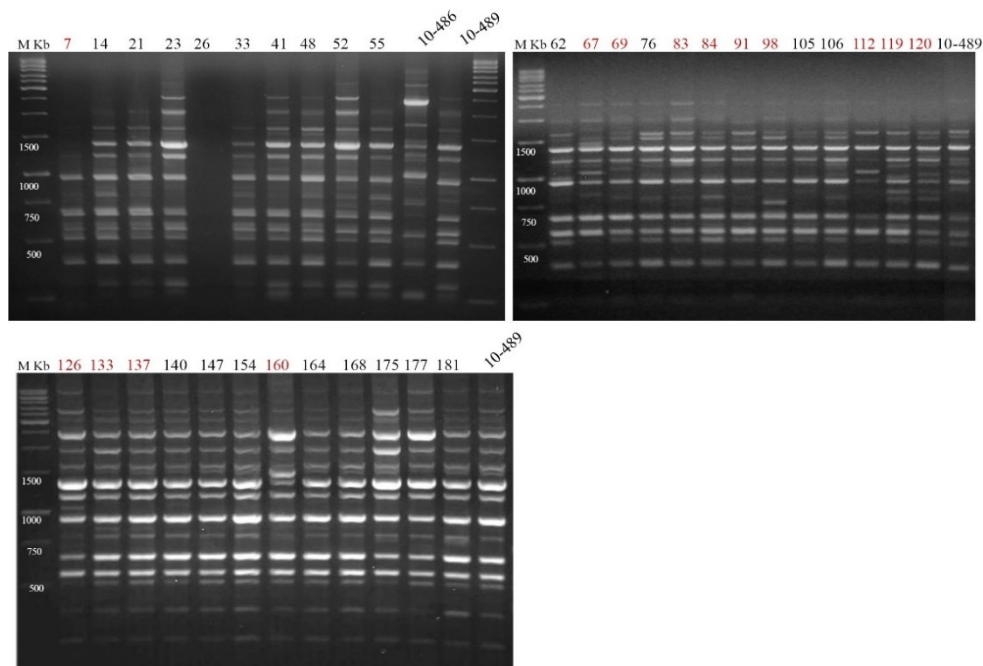
26. ábra: A multistarter kultúrával beoltott tétel *S. uvarum* gyanús izolátumainak RAPD 1283 mintázatai. Pirossal jelölve az eltérő kariotípussal rendelkező törzsek. 10-486 általunk beoltott *S. uvarum* törzs mintázata.

A tisztán csak *S. cerevisiae* törzssel (10-489) beoltott fermentációból izolált törzsek közül 38-at választottunk is asszimilációs teszteredményeik alapján (7, 14, 21, 23, 26, 33, 41, 48, 52, 62, 67, 69, 76, 83, 84, 91, 98, 105, 106, 112, 119, 120, 126, 133, 137, 140, 147, 154, 160, 164, 83, 84, 164, 168, 171, 175, 177, 181). A 10-489-től kariogramon detektálható eltérés az 48, 67, 105, 160 izolátumok esetén figyelhető meg. Nagyon valószínű, hogy ezek vad *S. cerevisiae*-k (27. ábra).



27. ábra: A 10-489 *S. cerevisiae* kultúrával beoltott tétel *S. cerevisiae* gyanús izolátumainak kariotípusai. Pirossal a feltételezhetően vad *S. cerevisiae* törzsek. 10-489 az általunk beoltott *S. cerevisiae* törzs mintázata.

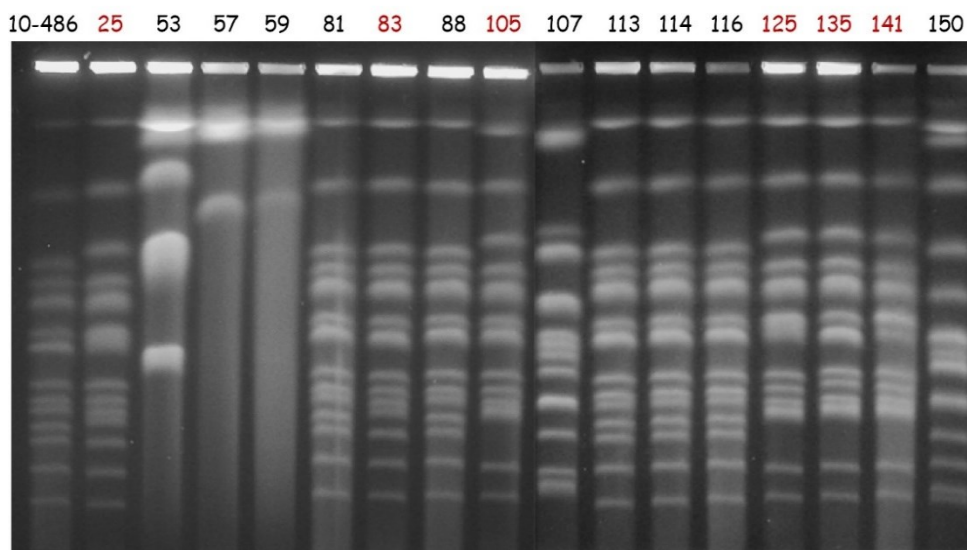
A RAPD 1283 vizsgálat diverzebb mintázatot eredményezett. A 10-489 sávmintázatától 18 eltérő mintázatot mutattak az alábbi izolátumok: 7; 67; 69; 83; 84; 91; 98; 112; 119; 120; 126; 133; 137; 160. Összevetve a kariogramok elemzésével a 67-es és a 160-as minta az, ahol mind a CHEF, mind a RAPD PCR eltérést mutat a beoltott törzs mintázatához képest. Ezek az izolátumok nagy valószínűséggel vad *S. cerevisiae* törzsek. (28. ábra).



28. Ábra: A 10-489 *S. cerevisiae* kultúrával beoltott tétel *S. cerevisiae* gyanús izolátumainak RAPD 1283 mintázatai. Pirossal az eltérő mintázattal rendelkező törzsek.

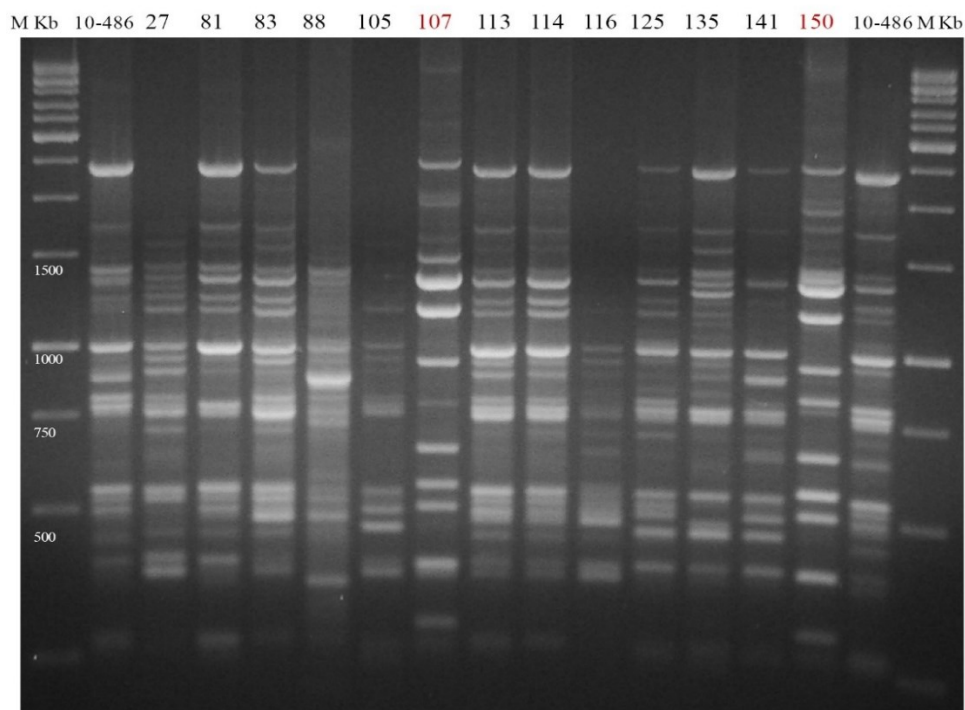
A *S. uvarum*-mal (10-486) beoltott tételből izolált asszimilációs teszt alapján *S. uvarum* gyanús törzsek közül 16-ot választottunk ki CHEF és RAPD 1283 vizsgálatra (25, 53, 57, 59, 81, 83, 88, 105, 107, 113, 114, 116, 125, 135, 141, 150). A kariogrammok alapján 6 db izolátum, a 25, 83, 105, 125, 135, és a 141 rendelkezett a beoltott 10-486 törzstől eltérő mintázattal (29. ábra). A 107-es és a 150 izolátum a kariogram alapján *S. cerevisiae* lehet. Az asszimilációs teszteken alapuló taxonómiai meghatározás bizonytalanságára remek példák az 53, 57 és az 59-es izolátumok, melyek

hiába mutattak hasonló asszimilációs profilt, mint a *S. uvarum*, a kariogrammjuk alapján nem *Saccharomyces* élesztők.



29. ábra: A 10-486 *S. uvarum* kultúrával beoltott tétel *S. uvarum* gyanús izolátumainak kariotípusai. Pirossal a feltételezhetően vad *S. uvarum* törzsek.

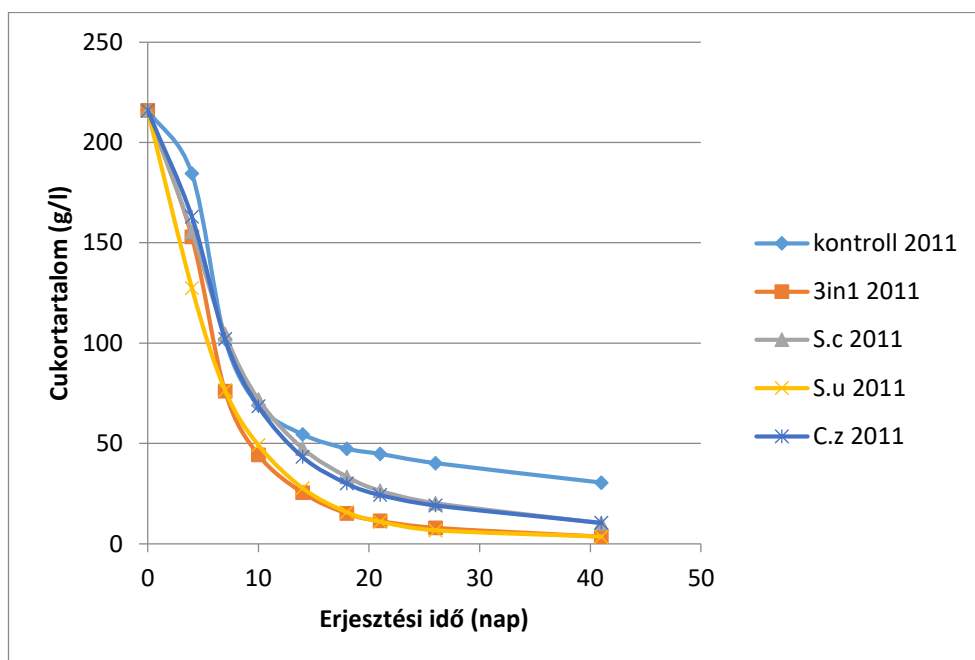
Az 53, 57 és az 59 nem *Saccharomyces* élesztők. A 107 és a 150 feltételezhetően *S. cerevisiae* törzsek a mintázatuk alapján. A törzsek RAPD 1283 elemzése magasabb fokú diverzitást mutatott (30. ábra). A 107 és a 150 izolátumokat ebben az esetben is eltérő mintázat jellemezte. Feltételezhetően nem *S. uvarum*-ok, hanem *S. cerevisiae* törzsek.



30. ábra: A 10-486 *S. uvarum* kultúrával beoltott tétel *S. uvarum* gyanús izolátumainak RAPD 1283 mintázatai. Pirossal jelölve feltételezhetően *S. cerevisiae* törzsek.

#### A 2011-es év erjesztési kísérletének eredményei

2011-ben is a Tokaj Kereskedőház Zrt. pincészetében állítottunk be erjesztési kísérletet. A mustunk furmint szőlőből készült. A kezdeti cukortartalma 216,0 g/l, savtartalma 5,7 g/l volt. A must egy alap kénezést kapott melynek hatására 4mg/l lett a szabad- és 54 mg/l az összes kén szintje. A beoltások rendje és térfogatai a 2010-es évnek megfelelően, annak ismétléseként állítottuk be. Az erjedés lefolyását a cukorfogyás mérésével követtük nyomon (31. ábra).



31. ábra: A 2011-es erjesztési kísérlet fermentációs dinamikája a cukorfogyás alapján. 3 in 1: 10-374+10-486+10-489; S.c.: 10-489; S.u.: 10-486; C.z.:10-374

Az erjedés dinamikáján látható, hogy a legdinamikusabban a *S. uvarum*-mal (10-486) beoltott tétel kezdett el erjedni. Ezt magyarázhatja a *S. uvarum* hidegtűrő képessége, amivel képes lerövidíteni az erjedési hőmérséklethez való adaptáció idejét. Utána a multistarter kultúrával (3in1) beoltott tétel erjedt hatékonyan. Az erjedés 10. napjától már az a tétel erjedt a legintenzívebben. Legvontatottabban a nem beoltott kontroll és a *C. zemplinina*-val (10-374) beoltott tétel erjedt. Az erjedés során és az elkészült borokban mért analitikai eredményeket a 21. táblázat tartalmazza.

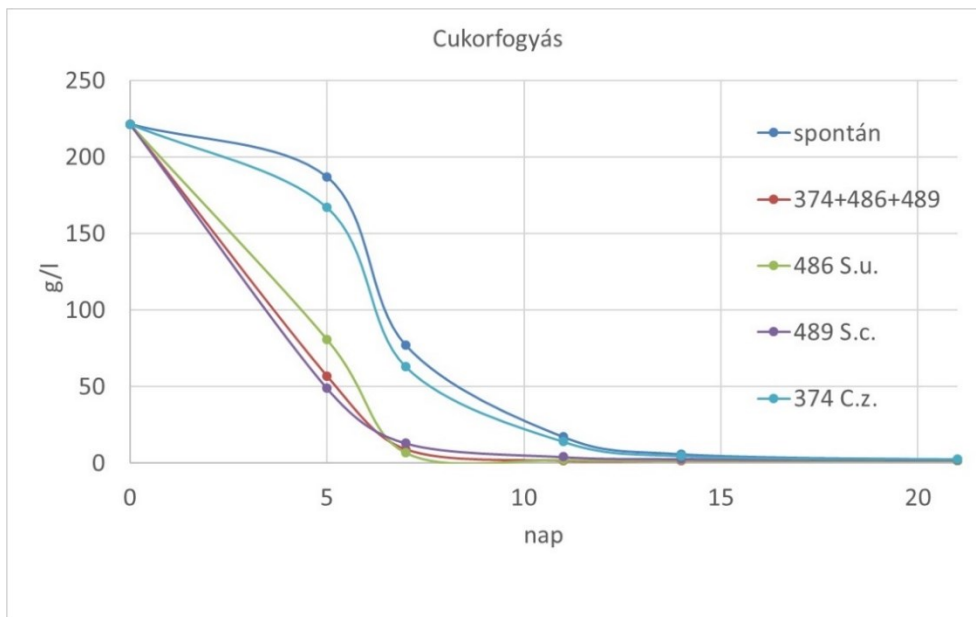
21. táblázat: A 2011-es erjesztési kísérlet analitikai eredményei. (n.m. = nem mértük) 3 in 1: 10-374+10-486+10-489; S.c.: 10-489; S.u.: 10-486; C.z.:10-374

Minta	Nap	Alkohol tartalom v/v%	Cukor tartalom g/l	Sav tartalom g/l	Illósav tartalom g/l	Extrakt tartalom g/l
must	0	0,0	216,0	5,7	n.m.	n.m.
Spontán	4.	1,26	184,5	n.m.	n.m.	n.m.
3 in 1		2,52	153,0	n.m.	n.m.	n.m.
S.c.		3,0	155,5	n.m.	n.m.	n.m.
S.u.		4,5	127,5	n.m.	n.m.	n.m.
C.z.		2,37	163,0	n.m.	n.m.	n.m.
Spontán	7.	6,7	102,0	n.m.	n.m.	n.m.
3 in 1		7,94	76,0	n.m.	n.m.	n.m.
S.c.		6,39	104,5	n.m.	n.m.	n.m.
S.u.		7,76	76,5	n.m.	n.m.	n.m.
C.z.		6,45	102,0	n.m.	n.m.	n.m.
Spontán	10.	8,84	69,00	n.m.	n.m.	n.m.
3 in 1		10,0	44,40	n.m.	n.m.	n.m.
S.c.		8,46	72,00	n.m.	n.m.	n.m.
S.u.		9,64	49,20	n.m.	n.m.	n.m.
C.z.		8,77	68,50	n.m.	n.m.	n.m.
Spontán	14.	9,67	54,50	n.m.	n.m.	n.m.
3 in 1		11,2	25,50	n.m.	n.m.	n.m.
				n.m.	n.m.	n.m.
S.c.		9,96	47,50	n.m.	n.m.	n.m.
S.u.		10,9	27,70	n.m.	n.m.	n.m.
C.z.		10,23	43,30	n.m.	n.m.	n.m.
Spontán	18.	10,19	47,40	n.m.	n.m.	n.m.
3 in 1		12,01	15,10	n.m.	n.m.	n.m.
S.c.		11,04	33,40	n.m.	n.m.	n.m.
S.u.		11,89	15,70	n.m.	n.m.	n.m.
C.z.		11,24	30,10	n.m.	n.m.	n.m.

Minta	Nap	Alkohol tartalom v/v%	Cukor tartalom g/l	Sav tartalom g/l	Illósav tartalom g/l	Extrakt tartalo m g/l
Spontán	21.	10,44	44,80	n.m.	n.m.	n.m.
3 in 1		12,21	11,40	n.m.	n.m.	n.m.
S.c.		11,46	26,40	n.m.	n.m.	n.m.
S.u.		11,96	11,00	n.m.	n.m.	n.m.
C.z.		11,47	24,40	n.m.	n.m.	n.m.
Spontán	26.	11,37	40,20	n.m.	n.m.	n.m.
3 in 1		12,54	8,00	n.m.	n.m.	n.m.
S.c.		11,82	20,20	n.m.	n.m.	n.m.
S.u.		12,41	6,70	n.m.	n.m.	n.m.
C.z.		12,07	19,20	n.m.	n.m.	n.m.
Spontán	41.	11,41	30,50	6,0	0,32	26,27
3 in 1		12,88	3,60	5,9	0,27	31,46
S.c.		12,56	10,20	6,1	0,47	29,18
S.u.		12,73	3,50	6,3	0,21	27,84
C.z.		12,8	10,50	5,9	0,36	27,21

#### A 2012-es év erjesztési kísérletének eredményei

2012-ben is a Tokaji Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben állítottunk be az erjesztési kísérletet. A szüret időpontja 2012.09.26-án volt, a mustunk furmint szőlőből készült. A kezdeti cukortartalma 221,5 g/l, savtartalma 6,1 g/l volt. A must egy alap kénezést kapott melynek hatására 11 mg/l lett a szabad- és 63 mg/l az összes kén szintje. A beoltásokat 25 literes üvegballonokban végeztük. A beoltások rendje és térfogatai a 2010-es és a 2011-es évnél megfelelően, azok ismétléseként állítottuk be. Az erjedés lefolyását a cukorfogyás mérésével követtük nyomon (32. ábra).



32. ábra: A 2012-es erjesztési kísérlet fermentációs dinamikája.  
 3 in 1: 10-374+10-486+10-489; S.c.: 10-489; S.u.: 10-486;  
 C.z.:10-374

2012-ben a 10-489 *S. cerevisiae*-vel és a multistarter kultúrával beoltott tételek kezdtek a legdinamikusabban erjedni. Az erjedés 7. napjára a *S. uvarum* –mal beoltott tétel is felzárkózott hozzájuk és túljutottak az erjedés zajos fázisán. Leglassabban ebben az évjártban is a spontán és a *C. zemplinina*-val beoltott tételek erjedtek. Az erjedésük lefutása nagyon hasonló volt, kicsit elhúzódó a *Saccharomycesek* és a kevert beoltásunkhoz képest. Az erjedés 21. napjára mindegyik tételünk szárazra kiejedt. Az erjedés során mért cukortartalmakat a 22. táblázat és az elkészült borok analitikai eredményeit a 23. táblázat tartalmazza.

22. táblázat: A 2012 évjárat erjedése során mért cukortartalmak. 3 in 1: 10-374+10-486+10-489; S.c.: 10-489; S.u.: 10-486; C.z.:10-374

Törzs	cukortartalom g/l					
	0. nap	5. nap	7. nap	11. nap	14. nap	21. nap
spontán	221,50	187,00	77,00	17,00	5,65	1,80
3 in 1	221,50	57,00	9,00	1,40	1,40	1,40
S.u.	221,50	81,00	6,90	2,15	1,90	1,75
S.c.	221,50	49,00	13,00	4,00	2,65	2,05
C.z.	221,50	167,00	63,00	14,00	4,55	2,50

23. táblázat: Az elkészült 2012-es borok alap analitikai eredményei  
3 in 1: 10-374+10-486+10-489; S.c.: 10-489; S.u.: 10-486;C.z.:10-374

Minta	Alkohol tartalom v/v%	Cukor tartalom g/l	Sav tartalom g/l	pH	Illósav tartalom g/l
spontán	12,84	1,80	6,4	3,25	0,54
3 in 1	12,73	1,40	6,37	3,39	0,90
S.u.	12,40	1,75	6,55	3,18	0,78
S.c.	12,76	2,05	6,32	3,23	0,60
C.z.	12,71	2,50	6,27	3,26	0,63

A kész borokat egy hét fős bizottság bírálta 100 pontos szempontrendszer szerint. A bírálat során a legalacsonyabb pontszámot a kontroll, a spontán erjedő tétel kapta  $73,86 \pm 4,45$  pontszámmal. A második legalacsonyabb pontszámmal a multistarter kultúrával beoltott tétel lett jellemezve  $76,0 \pm 3,65$  értékkel. Érdekes, hogy a tiszta tenyészetek magasabb

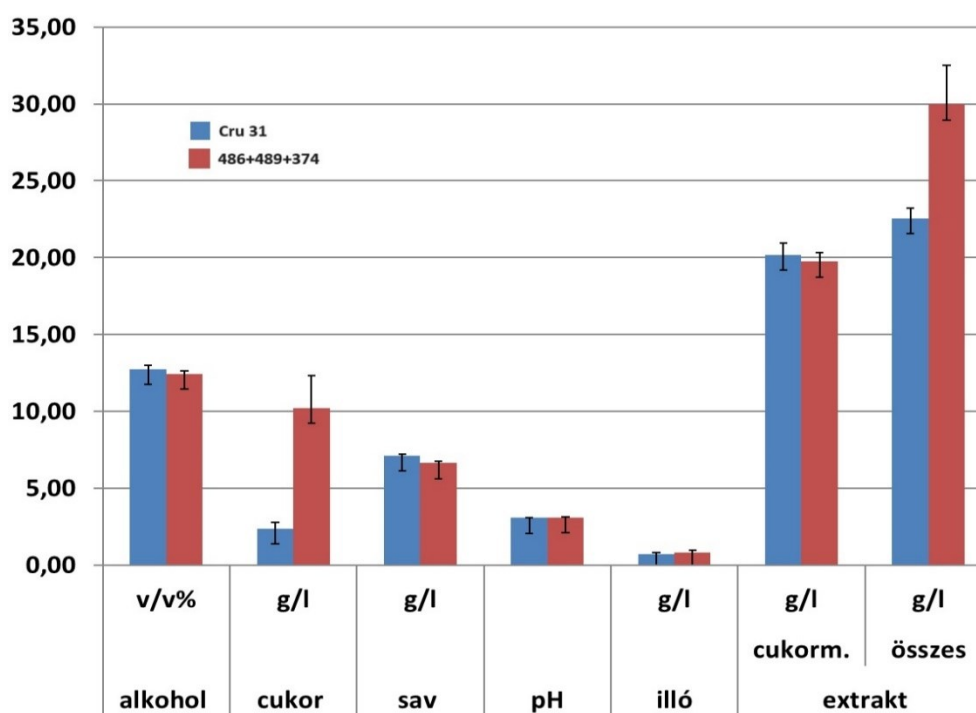
átlag pontszámmal végeztek, de mindegyik esetben jelentősebb szórással. A *S. cerevisiae*-vel (10-489) kierjesztett tétel  $79,29 \pm 6,26$ , a *S. uvarum*-mal (10-486)  $80,00 \pm 9,49$ , míg a *C. zemplina*-val (10-374) erjesztett tétel  $77,71 \pm 7,76$  pontszámot kapott. A magas szórás értékek arra engednek következtetni, hogy az adott borok jobban megosztották a bírálókat a multistarterrel erjesztett tételhez képest.

#### 2013 erjesztési kísérlet

2013-ban egy tarcali borászat jelentkezett, hogy kipróbálná a multistarter kultúrákat furmint bor erjesztéshez. A kísérletben négy 220 literes hordót kontrollként kereskedelmi starterkultúrával a Mycoferm CRU31 élesztővel oltottunk be, öt db 220 literes hordót pedig a multistarter kultúrákkal (10-489+10-486+10-374). Az erjedés végén vizsgáltuk a kierjedt borokat klasszikus analitikai módszerekkel, illetve headspace gázkromatográfiás tömegspektrometriás módszerrel, hogy összehasonlítsuk az erjedések alatt keletkezett illó komponenseket is. Az analitikai eredményeket a 24. táblázat és a 33. ábra mutatja.

24. táblázat: A 2013 évjárat kísérleti erjesztéseinek alap analitikai eredményei. 486+489+374: 10-486 (S.u.)+10-489 (S.c.)+10-374 (C.z.); CRU31: Ever Mycoferm CRU 31

Azonosító	Alkohol v/v%	Cukor g/l	Sav g/l	pH	Illó g/l	Extrakt g/l	
						cuk.m	összes
CRU 31	12,75 ±0,24	2,36 ±0,39	7,13 ±0,11	3,07 ±0,03	0,73 ±0,06	20,19 ±0,78	22,55 ±0,68
486+489+ 374	12,43 ±0,21	10,21 ±2,14	6,63 ±0,12	3,09 ±0,02	0,84 ±0,12	19,75 ±0,57	29,96 ±2,56



33. ábra: A 2013 évjárat kísérleti erjesztéseinek alap analitikai eredményei. 486+489+374: 10-374 (C.z.)+10-486 (S.u.)+10-489 (S.c.); Cru31: Ever Mycoferm CRU 31

A gázkromatográfiás elemzés során a tételket külön-külön mértük meg, majd a kapott eredményeket átlagoltuk. A kereskedelmi starterkultúrával (CRU 31) beoltott borból 29, míg a multistarter kultúrával beoltott tételből 31 aromakomponenst sikerült elválasztanunk. Az aromakomponensek egymáshoz viszonyított relatív koncentrációit a Melléklet 2, 3 és a 4. ábrája tartalmazza. A beazonosított aromakomponensek érzékszervi jellemzőit adatbázisokból kikerestük. Egyet sem találtunk, mely kellemetlen, a bor minőségére negatív érzékszervi tulajdonsággal rendelkezne. Az alábbiakban a 25. táblázatban azokat a vegyületeket részletezem, melyek kizárólag csak a saját multistarter kultúrával erjesztett borban voltak kimutatási koncentráció felett, vagy jelentősen nagyobb koncentrációban voltak mérhetőek a kereskedelmi starterkultúrával erjedt borral szemben.

25. táblázat: A multistarter kultúrával erjesztett borban a kontroll borhoz képest magasabb koncentrációban kimutatható aromakomponensek érzékszervi tulajdonságai

Vegyület neve	CAS szám <sup>1</sup>	Érzékszervi tulajdonság
Amil-acetát	628-63-7	banán, körte, alma
Etil-butirát	105-54-4	alma, ananász, konyak, kék sajt
Kaprónsav	142-62-1	édes, Napa Gamay bor, sajt, zsír,
Kaprilsav	124-07-2	édes, sajt, olaj, kókuszolaj
Dietil-szukcinát	123-25-1	gyümölcs, szőlő, alma, barack, áfonya, csokoládé
Etil-palmitát	693-38-9	kellemes édes, krém, balzsam, viasz
Etil-laurát	106-33-2	kellemes édes, virág, levél, szappanos
Etil-dekanoát	110-38-3	alma, brandy, szőlő, körte

1: Chemical Abstract Service (Kémiai Nyilvántartó Szolgálat)

## 6. Eredmények megbeszélése

A régi tokaji izolátumok taxonómiai hovatartozásának a meghatározásához a modern élesztő-taxonómiában alkalmazott molekuláris vizsgálatokat és fiziológiai vizsgálatokat végeztünk. A D1/D2 domének és az rDNS ITS régióinak a szekvencia elemzése, továbbá a fiziológiai vizsgálatok alapján mindegyik izolátum *S. cerevisiae*-nek bizonyult. *S. uvarum*-ot nem találtunk közöttük, habár a *S. uvarum* elég gyakori a Tokaji Borvidéken (Minarik és Laho, 1962; Sipiczki és Mtsi., 2001; Antunovics és Mtsi., 2005; Magyar és Bene, 2006).

Bár az rDNS-analízis az összes törzset egyértelműen *S. cerevisiae*-hez rendelte, az rDNS szekvenciáik nem voltak azonosak, két csoportra oszlottak (I-típus és II-típus). A II. típusú törzsek a D1/D2 domén két pozíciójában és a két ITS-szegmens öt helyen különböztek a *S. cerevisiae* neotípus törzsetől. Számos Szlovákiában és Ausztriában izolált borélesztő törzs adatbázis szekvenciáiban ugyanezeket az eltéréseket találtuk a neotípus törzssel összehasonlítva. Mindezen különbségek egyidejű jelenléte a közép-európai földrajzi régióra jellemző „őshonos” *S. cerevisiae* borélesztő törzseinek egy (al) populációjának specifikus molekuláris markere lehet. Úgy tűnik, hogy ezek a törzsek az autochtonikus élesztő bióta összetevői, amelyek hosszú ideig fennmaradtak, a Tokaj-törzsek izolálásának évei óta (1901-1906) és a két Szlovákiai törzs izalálásán keresztül (1954) egészen napjainkig (2017) amikor a két jégbor élesztő klónt izolálták Szlovákiában. A mintázat szórványos megjelenése bizonyos spanyol, egy francia és egy ausztrál borvidéken és különböző szubsztrátokon feltételezhetően közép-európai borászatokból származó elterjedésnek tulajdonítható. A II-típusú törzsek ITS

szekvenciájának a hasonlósága a Jura-n izolált hártya élesztők ITS szekvenciájával (Charpentier és Mtsi., 2009) szoros kapcsolatra utal a két csoport törzsei között. További kísérletekre van szükség ennek a lehetőségnek az ellenőrzéséhez, mivel a Jura törzsek esetében nem állnak rendelkezésre D1/D2 szekvenciák, a Tokaj törzsek.

A kevésbé konzervált molekuláris markerek (interdelta, MSP, mitokondriális DNS és kariatípus) összehasonlító elemzése sokkal nagyobb változatosságot mutatott ki a törzsek között. Amikor az összes markert együttesen vesszük figyelembe, a törzsek túlnyomó többsége egyedi mintázattal rendelkezik, ami arra utal, hogy a legtöbb törzs egyedi genomszerkezettel rendelkezik. Ez alól kivételek az I-típusú szekvenciával rendelkező törzspár, a 10-1354 (T15) /10-1355 (T18) és a II-típusú szekvenciával rendelkező törzs pár, a 10-1347 (T7) /10-1349 (T9) amelyek tagjai minden tesztben megkülönböztethetetlenek voltak. Érdekes, hogy egyik párt sem izolálták ugyanarról a helyről, és ugyanabból az évjáratból. Ezen azonosságoktól eltekintve mind az I., mind a II. típusú törzscsoportok változatosak voltak, de figyelemre méltó módon jól elkülönülő klasztereket alkottak, mintha biológiailag izoláltak lennének.

A molekulárisan megkülönböztethetetlen törzsek eltérő eredete azt jelzi, hogy az 1900-as évek elején a tokaji régióban olyan *S. cerevisiae* törzseknek kellett létezniük, melyek több borászatban is tartósan jelen voltak. A 10-1354 (T15) / 10-1355 (T18) és a 10-1347 (T7) / 10-1349 (T9) törzspárok molekuláris mintáinak azonossága arra utal, hogy genomjuk nem változott a laboratóriumi törzsfenntartás évtizedei alatt. Ezzel szemben bizonyos törzsek, amelyeket ugyanazon a helyen és évben izoláltak (például 1901-ben Tarcalban izolált 5 törzs), különböző molekuláris mintázattal rendelkeztek.

Ezek a törzsek már az izoláláskor is különbözhetnek egymástól, de az is lehetséges, hogy ugyanabból a klónból származnak és csak később, a laboratóriumi körülmények közötti szaporítás során váltak el egymástól. A molekuláris minták összehasonlításakor azonban szem előtt kell tartani, hogy az ujjlenyomat-módszereknél a magas szintű reprodukálhatóság érdekében minden törzsre pontosan azonos feltételeket kell alkalmazni minden reakcióban (pl. Pfliegler és Mtsi., 2014), és a sávmintázatokban bekövetkező kisebb változásokat gyakran nehéz értékelni. Továbbá az interdelta elemzés során megfigyelt nagyobb diverzitás nem feltétlenül tükrözi pontosan a törzsek izolálásának idején fennálló diverzitást, mivel a különböző tartósítási módszerek által a törzsekre gyakorolt specifikus stresszhatások mobilizálhattak bizonyos Ty1 retrotranszpozonokat (amelyekhez a delta szekvenciák részben kapcsolódnak). Például egy korábbi vizsgálatban (Stamenova és Mtsi., 2008) a fagyasztás és felolvasztás növelte a Ty1 transzpozícióknak a gyakoriságát.

Némileg váratlanul ért minket, hogy nem találtunk összefüggést a kariotípusok és a törzsek eredete között. Nem tudjuk, hogy milyenek lehettek a kariotípusok a törzsek izolálásakor, de nyilvánvaló, hogy a tartós laboratóriumi törzsfenntartás nem tette őket egyformává. Érdekes itt megemlíteni, hogy egy korábbi vizsgálatban nem találtunk összefüggést a kromoszóma mintázatok és, hogy földrajzilag honnan és milyen borból voltak a *Saccharomyces* törzsek izolálva (Csoma és Mtsi., 2010). Egy másik vizsgálatban nem találtak összefüggést a hártya képződésének képessége és a törzsek kariotípusai között, míg a hártya képződés és bizonyos interdelta és mikroszatellit minták között egyértelmű összefüggés volt megfigyelhető (Charpentier és Mtsi., 2009; Legras és Mtsi., 2014).

A nagy molekuláris diverzitással együtt járt bizonyos fenotípusos tulajdonságok és jellemzők, például a telepmorfológia, a sejtmorfológia, a sporuláció hatékonysága és a H<sub>2</sub>S-termelés viszonylag nagy változatossága. A diverzitás alacsonyabb volt a killer aktivitás fenotípusában és a flokkuláció viszonylatában. Ha az összes tulajdonságot egybe vesszük, gyakorlatilag minden törzs egyedi fenotípussal rendelkezik. Ez összhangban van a molekuláris (genetikai) vizsgálatok eredményeivel, amelyek szinte minden törzset egyedinek határoztak meg. A nagyfokú fenotípusos diverzitás tulajdonképpen nem meglepő, mert a fenotípust alapvetően a genotípus határozza meg. A legújabb eredmények (pl. Granek és Magwene, 2010) például kimutatták, hogy a *S. cerevisiae* telepek morfológiáját olyan genetikai determinánsok komplex hálózatai irányítják, amelyek más sejt folyamatokban is részt vesznek, mint például a tápanyag szignálok integrálása és a környezet bizonyos változásaira adott válaszok. A sporuláció egy másik olyan tulajdonság, amelyet összetett genetikai kölcsönhatások szabályoznak. A sporuláció fő meghatározója a párosodási típus heterozigótasága (a homotallikus törzsek sejtjei általában heterozigóták) de a folyamat hatékonysága számos downstream gén működésétől függ (Herskowitz, 1988). Ezen gének bármelyikének inaktiválása vagy csökkent aktivitása megakadályozhatja a sporulációt, vagy legalábbis csökkentheti annak hatékonyságát. A gyenge sporuláció másik oka a kromoszóma-heterogenitás lehet, amely rontja a kromoszóma párosodás pontosságát a meiózis profázisában. A nem megfelelő kromoszómapárosodás elsősorban a fajok közötti hibridekben fordul elő, amelyek két (részben) különböző kromoszóma készlettel rendelkeznek (Karanyicz és Mtsi., 2017). Mivel a Tokaj törzsek egyikének sem volt számfeletti sávja a kariotípusában, így valószínűtlen,

hogy ezek közül bármelyik interspecifikus hibrid vagy alloaneuploid genommal rendelkezne. Számos tanulmány bizonyította, hogy az élesztőkultúrák alkalmazkodása a változó körülményekhez általában genomikai változásokkal jár (adaptív evolúció), és az azonos stresszfeltételeknek hosszabb ideig kitett különböző kultúrákban általában a hasonlóan megváltozott genomok (beleértve a kariotípusok hasonló változásait) változatai válnak dominánssá (konvergens adaptív evolúció) (pl. Gresham és Mtsi., 2008; Mangado és Mtsi., 2018; Piotrowski és Mtsi., 2012). Érdekes módon úgy tűnik, hogy a hosszú távú laboratóriumi fenntartás nem váltott ki kimutatható konvergens adaptív evolúciót a tokaji törzsek genomszerkezetében és fiziológiai tulajdonságaiban.

A borászati szempontból fontos fenotípusos jellemzők tekintetében az egyes tulajdonságok sokfélesége jelentős eltéréseket mutatott. A törzsek a H<sub>2</sub>S-termelésben (mind a szilárd táptalajon, mind a fermentációs körülmények között) és a kezdeti fermentációs erősségben nagymértékben eltértek egymástól. A glicerintermelésben mérsékelten, a fermentációs teljesítményben, az etanoltermelésben és a fermentáció végén mért savtermelésben a legtöbbjük csak kis mértékben különbözött egymástól. Érdekes, hogy a legtöbbjük jobban teljesített, mint a kereskedelmi starterkultúra törzse és sokkal jobbak voltak, mint a laboratóriumi törzs (S288C) a szőlőből készített must erjesztése közben. Azt továbbra sem tudjuk, hogy ezek a törzsek milyen erjesztési képességekkel rendelkeztek izolálásuk idején, de a laboratóriumi erjesztési kísérleteinkben nyújtott jó teljesítményük azt bizonyítja, hogy a hosszú ideig tartó, nem borászati környezetben történő fenntartás nem hatott károsan az erjesztési képességükre nézve. Ez a megállapítás kétségeket ébreszt a széles

körben elterjedt nézettel kapcsolatban, miszerint a laboratóriumi körülmények közötti tartós tenyésztés veszélyezteti a törzsek fermentációs képességeit (Pizarro Mtsi., 2007). Soós és Ásvány (1950) publikációjában nem térnek ki rá a törzsfenntartás körülményeire, de Soós István Borbakterológia (1948) című könyvében ismertettek egy módszert a hosszú ideig tartó laboratóriumi törzsfenntartásra. Abban 10%-os szacharózoldatot használtak egy parafinnal lezárt „Fredenreich-lombikban”. Ezt a lombikot sötét helyen, alacsony hőmérsékleten tárolták. Ötévente frissítették a törzseket. Ezzel a módszerrel tartották fent a törzseket az 1980-as évekig. Ezt követően a törzseket liofilizálták. Az általunk felhasznált törzsampullán 1985-ös dátum volt feltüntetve.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a százéves gyűjtemény egyes tagjai jó alternatívák lehetnek a Tokaji borvidéken széles körben használt régió-idegen kereskedelmi starterkultúrák kiváltására. Azonban további vizsgálatokra van szükség az ilyen célokra legalkalmasabb törzsek kiválasztásához.

Mindazonáltal a monokultúras starterkultúrák alkalmazása kezd a háttérbe szorulni a borászati technológiában. A munkánk egy további célja volt, hogy Tokaji szelektálású több élesztőfaj keverékéből álló starterkultúrát is kifejlesszünk. Korábbi eredményeink alapján tudjuk, hogy a borvidékre jellemző a kryotoleráns *S. uvarum* törzsek jelenléte, illetve a borvidékről sikerült izolálni és leírni a *C. zemplinina* ozmotoleráns és fruktofil fajt. Ezen eredmények alapján úgy gondoltuk, hogy a *S. cerevisiae* élesztőfaj mellé szerencsés párosítás lehet a fent említett két másik faj. A törzsgyűjteményünkben számos helyi izolálású törzs állt rendelkezésünkre, melyek borászati képességei ezidáig ismeretlenek voltak számunkra.

A *C. zemplinina* borászati tulajdonságairól a kísérleteink idejében még nem állt rendelkezésre széles szakirodalmi adat, így a velük való ismerkedésünket nagyobb törzsszámmal kezdtük el és bevontunk a kezdeti kísérleteinkbe más földrajzi helyről és nem csak borászati környezetből izolált törzseket is.

A tokaji édes borok erjesztése során az élesztőkre ható legkomolyabb szelekciós nyomás a mustok rendkívül magas cukortartalma, mely jelentős ozmotikus stresszként szűkíti az erjesztést teljesíteni képes élesztők számát. Ezért a szelekciónk során fontos szempontként értékeljük a törzsek ozmotoleranciáját.

A *C. zemplinina* törzsek etanoltermelő képességének vizsgálatára tesztfermentációkat végeztünk. A táptalajban lévő 20% w/v-os glükózból csak egy törzs termelt viszonylag kis mennyiségű etanolt 20 napos 25°C-on történő erjesztés után (a 11-10 törzs 8,52, v/v%-kal), míg a törzsek többsége képes volt 9 (v/v%) feletti etanol termelésére. A 12°C-on végzett tesztfermentációkban az etanoltermelésben sokkal nagyobbak voltak a különbségek (mindössze 3,7 és majdnem 10,3 (v/v%) között)

A törzsek viszonylag kis változatosságot mutattak savtermelő profiljukban. Jelentős (0,3 g/l-nél nagyobb) almasavtermelés egyik törzsnél sem volt megfigyelhető, míg az ecetsavtermelés 1,3 és 2,9 g/l között mozgott a törzstől és a fermentáció hőmérsékletétől függően. A termelt ecetsav mennyisége 12°C-os fermentációs hőmérsékleten minden *C. zemplinina* törzsnél magasabb volt, mint 25°C-on.

A törzsek erjesztési teljesítményére a CO<sub>2</sub> elillanásából adódó tömegvesztéséből következtettünk. A törzsek többsége 25°C-on viszonylag

gyors és erőteljes erjedést mutatott. Az erjedés erőssége 12°C-on mérsékelten csökkent.

Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a *C. zemplinina* törzsek önmagukban nem képesek a borokat kierjeszteni, de alkalmasak lehetnek kevert starterkultúrák alkotórészeként részt venni az erjesztésben.

Bevontunk öt Tokaji borvidékről izolált *S. uvarum* és tíz *S. cerevisiae* törzset a vizsgálatainkba. A fiziológiai eredményeik kevésbé voltak változatosak a *C. zemplinina* törzsekhez képest. A törzsek leginkább a 12 °C-on mutattak eltérő erjesztési dinamikát. A *S. cerevisiae* törzsek kénhidrogén termelő képessége 12°-on kedvezőbbnek bizonyult a *S. uvarum*-okhoz képest.

A végső törzsek kiválasztásánál súlyozottan vettük figyelembe a törzsek aromatermelő képességét. A Tokaji borvidékről izolált *C. zemplinina*, *S. cerevisiae* és *S. uvarum* törzsekkel próbaerjesztést is végeztünk sárgamuskotály mustban, hogy érzékszervi szempontok alapján is tudjuk értékelni a törzseket. A *C. zemplinina* törzsek közül a 10-374  $14,75 \pm 1,71$  és a II SE 12  $14,75 \pm 1,91$  összpontszámmal holtversenyben végeztek az érzékszervi bírálaton. A 10-374 ozmotoleranciája miatt került kiválasztásra, mivel 60% w/v glükóztartalom mellett is képes volt növekedni, míg a II SE 12 törzs csak 40% w/v mellett. A *S. cerevisiae*-k közül a 10-489 kapta a legjobb értékelést az érzékszervi bírálat során ( $15,00 \pm 1,26$ ), míg a *S. uvarum*-ok között a 10-486 teljesített a legjobban ( $15,25 \pm 2,06$ ). A kiválasztott törzsek nem rendelkeznek killer aktivitással és nem is szenzitívek a K1 és a K2 toxinra. Ez a tulajdonság kérdéseket vetett fel a mustban már jelen lévő vad *Saccharomyces*-ekkel való versenyképességükre vonatkozólag, de a félüzemi

erjesztési kísérletek során bebizonyosodott, hogy nem jelent részükre hátrányt, nem szorítják ki őket a vad törzsek.

A *C. zemplinina* esetében még izgalmasabb kérdés volt, hogy miként tud konkurálni a kevert tenyészetben a két jó erjesztőképességű *Saccharomyces* fajjal az erjedés során. A kérdés megválaszolása érdekében eltérő arányokban összekeverve, különböző szelekciós paraméterekkel (20% w/v, 40% w/v glükóz, +8%v/v etanol) rendelkező tápfolyadékban követtük nyomon a fajok interakcióját. A legzordabb összetételű tápfolyadékban és a leghátrányosabb 1:4 (*C. zemplinina* : *Saccharomyces spp.*) arányú leoltásokban is kimutatható koncentrációban vissza tudtuk izolálni a *C. zemplinina* (10-374) törzsünket 245 óra elteltével is. A leoltások alapján a *S. uvarum* (10-486) erőteljesebben konkurál a *C. zemplinina*-val, mint a *S. cerevisiae* (10-489) törzsünk.

A dolgozatban négy évjárat félüzemi kísérleti erjesztésének tapasztalatait tárgyaljuk. Az első évben fő feladatunk volt, hogy a beoltott törzsek versenyképességét, ezáltal valódi hatásukat az erjedésre igazoljuk. Az erjedés során végig mintáztuk a tételeinket és megpróbáltuk visszaizolálni az általunk beoltott törzseket. Az izolátumok asszimilációs profilját összehasonlítottuk a beoltott törzsek asszimilációs eredményeivel. Ezek alapján tudtunk *S. cerevisiae* és *S. uvarum* „starterkultúra gyanús” törzseket kijelölni. A kijelölt törzsekből random választottunk ki egyedeket, melyekkel kariotipizálást és RAPD 1283 elemzést végeztünk el. A kariotípus mintázat és a RAPD 1283 mintázat nem minden esetben fedett át. Általában a RAPD 1283 diverzebb mintázatot eredményezett. A módszerek kombináltan azonban minden esetben alkalmasnak bizonyultak a saját beoltott törzseink és a vad *S. cerevisiae* és vad *S. uvarum* törzsek megkülönböztetésére. A

genetikai markerezések eredménye szerint a fermentációk során az általunk beoltott *Saccharomyces* törzsek domináltak végig az erjedés alatt.

Minden évjáratban a törzseinkkel beoltott tételek probléma mentesen és dinamikusan kiejedtek. Ezzel teljesítik azt a fő elvárást miszerint a starterkultúrával való beoltással az erjedés elhúzódását és elakadását akarják a borászok kiküszöbölni. A *C. zeylanoides* törzseinkkel végzett fiziológiai tesztek eredményei alapján megállapítottuk, hogy önmagukban nem képesek a borokat kiejeszteni, de alkalmasak lehetnek kevert starterkultúrák alkotórészeként részt venni az erjesztésben. Ezt támasztják alá a félüzemi erjesztési kísérleteink során gyűjtött tapasztalataink is. Bár minden esetben a kontrollként használt spontán erjedő tételekhez viszonyítva gyorsabban erjesztette ki a borokat, de minden esetben elmaradt a *Saccharomyces*-ekkel és a kevert multistarter kultúrával beoltott tételek erjedési dinamikájától. Amikor önállóan oltottuk be az általa kiejesztett borok érzékszervi megítélése megosztó volt. 2010-ben volt olyan bíráló, aki izhibásnak jellemezte a borát, míg 2012-ban a 100 pontos bírálati rendszerben a legnagyobb szórással 66 minimum pontszámtól egészen a viszonylag magas 86 pontszámig teljesített. A kevert tenyészetben a jelenlétét a fruktofil tulajdonsága is indokolja. Az erjedések elakadását néha a mustban található glükóz és fruktóz arányának erős eltolódása okozhatja. Erjesztési kísérleteinkben is azt tapasztaltuk, hogy arányaiban hiába csak 2/3 arányban vannak jó erjesztő képességű fajok a multistarter kultúránkban, annak erjesztési erélye minden évjáratban közel azonos vagy dinamikusabb volt a 3/3 arányban jó erjesztő képességű tiszta *Saccharomyces* fermentációkkal összehasonlítva.

Érdekes, hogy a 2012-es év bírálata szerint a tiszta tenyészetek magasabb átlag pontszámmal végeztek, de mindegyik esetben jelentősebb szórással. A *S. cerevisiae*-vel (10-489) kiejlesztett tétel  $79,29 \pm 6,26$ , a *S. uvarum*-mal (10-486)  $80,00 \pm 9,49$ , míg a *C. zemplina*-val (10-374) erjesztett tétel  $77,71 \pm 7,76$  pontszámot kapott. A magas szórás értékek arra engednek következtetni, hogy az adott borok jobban megosztották a bírálókat a multistarterrel erjesztett tételhez képest. Néhány bíráló szöveges megjegyzést írt a bírálati lapra, ahol a multistarterrel erjesztett tételhez a komplex, gazdag aromák, tartalmas jelzőket írták. Ez a 2010-es bírálaton szerzett tapasztalatokkal összecseng, ahol bár pontozás nem történt, de egy teljesen más tagokból álló bizottság is a komplex, gyümölcsös íz, illat intenzív jelzőkkel illette.

2013-ban nagyobb tételben már csak a multistarter kombinációt hasonlítottuk össze egy kereskedelmi starterkultúrával, a Mycoferm CRU31-gyel. Alap analitikai paraméterekben nagy eltéréseket nem tapasztaltunk, de a gázkromatográfiás elemzés során a kereskedelmi starterkultúrával (CRU 31) beoltott borból 29, míg a multistarter kultúrával beoltott tételből 31 aromakomponenst sikerült elválasztanunk. Hét olyan aromakomponenst találtunk, melyek csak a saját starterkultúránkkal erjesztett borban voltak jelen, vagy megtalálhatóak voltak a kereskedelmi starterkultúrával kiejlesztett borban is, de a multistarter kultúrával erjedtben magasabb koncentrációban. A műszeres analitikai vizsgálat is alátámasztotta azt a célul kitűzött feladatunkat, hogy a kevert starterkultúránk kifejlesztésével szimulálni szeretnénk a spontán erjedésnek köszönhető gazdagabb aromakomplexitást a starterkultúrával való beoltás biztonságos erjedésével együtt.

## 7. Összefoglalás

A Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszéknek több mint három évtizedre nyúlik vissza a borászati jelentőségű élesztőgombák kutatása. A korábbi eredmények leginkább taxonómiai, genetikai és fiziológiai jellegűek voltak. Ezekre a rendkívül értékes eredményekre és az évtizedek alatt korábbi kutatások során begyűjtött tokaji izolálású élesztőtörzsekre alapozva alkalmazott kutatást terveztünk megvalósítani, melynek elején célul tűztük ki, hogy helyi szelektálású törzsekből álló multistarter élesztőkultúrát fejlesztünk ki a helyi borászatok részére.

A szakirodalmi adatok gyűjtése során került a látóterünkbe Soós és Ásvány lenyűgöző munkássága, mely abban a korszakban, több mint száz évvel ezelőtt rendkívül előre mutató és innovatív volt. Szerencsénkre az általuk izolált Tokaj törzseket a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye megőrizte és rendelkezésünkre bocsátotta. Ezeknek a törzseknek a vizsgálata színesítette a munkánkat.

Soós és Ásvány (1950) a 10-1347 és a 10-1358-as törzseket ajánlották leginkább beoltásra a bor erjesztéséhez. A saját vizsgálataink szerint is ez a két törzs emelkedett ki a többi közül a borászati tulajdonságaik alapján. Próbaerjesztések során a mai követelményeknek is megfelelő minőségű borokat voltak képesek kiereszteni. A kísérleteinkben tapasztalt ezen törzsek kiváló teljesítménye demonstrálja, hogy nem veszítették el a borászati tulajdonságaikat a több, mint 10 évtizedig tartó mesterséges törzsfentartás során. Ezzel megcáfoltunk egy korábbi elméletet, miszerint a jó erjesztési képességet elvesztik a törzsek, a jobb erjesztési teljesítményre irányuló nem

szelektív körülmények között történő hosszan tartó tenyésztés és törzsfenntartás során.

Továbbá izgalmas filogenetikai összefüggéseket is találtunk. Az rDNS-analízis az összes törzset egyértelműen *S. cerevisiae* fajhoz rendelte, az rDNS szekvenciáik viszont nem voltak azonosak, két csoportra oszlottak (I-típus és II-típus). A különbségek egyidejű jelenléte a közép-európai földrajzi régió *S. cerevisiae* borélesztő törzseinek egy őshonos (al) populációjának specifikus molekuláris markere lehet. Úgy tűnik, hogy ezek a törzsek az autochtonikus élesztő bióta összetevői lehettek, de ennek bizonyítása további vizsgálatot igényel. A mi vizsgálatunkba csak azokat a szekvenciákat vontuk be, amelyek 100% átfedést mutattak a saját szekvenciánkkal. Valószínűleg árnyalhatná a képet, ha bevonnánk azt a nagyszámú adattömeget, amit a 99%-ban átfedő szekvenciák jelentenek.

A fejezet elején említett eredményeink alapján tudjuk, hogy a borvidékre jellemző a kryotoleráns *S. uvarum* törzsek jelenléte, illetve a borvidékről sikerült izolálni és leírni a *C. zemplinina* ozmotoleráns és fruktofil fajt. Ezen eredmények alapján úgy gondoltuk, hogy a *S. cerevisiae* élesztőfaj mellé szerencsés párosítás lehet a fent említett két másik faj a multistarter kultúránkban. A három faj összesen 53 törzsét vizsgáltuk meg borászati szempontok alapján, hogy kiválasszunk 1-1 törzset közülük, melyekkel 4 évjáratban próbaerjesztéseket végeztünk.

A multistarter kultúránkkal beoltott tételek probléma mentesen és dinamikusán kiterjedtek minden évjáratban. Az érzékszervi bírálatok és a klasszikus és műszeres analitikai vizsgálataink eredményei alapján is

elmondható, hogy a létrehozott starterkultúrával kiváló minőségű borokat lehetett erjeszteni biztonságosan és reprodukálhatóan.

A Soós és Ásvány (1950) által elért eredmények előtt szeretnénk munkánkkal mi is tisztelni és célunk továbbra is folytatni ezt az izgalmas kutatási vonalat, mert a dolgozatban ismertetett eredmények még csak a kezdő lépések ahhoz, hogy a Tokaji Borvidéken dolgozó borászoknak hathatós megoldást nyújtsunk termékeik minőségének fokozásához. A tokaji borkülönlegességek, a rendkívüli ozmotikus kihívást jelentő késői szüretelésű édes borok és az aszúk erjesztéséhez szükséges speciális starterkultúrák kidolgozása még ránk vár.

## 8. Summary

The Department of Genetics and Applied Microbiology has been researching yeasts of oenological importance for more than three decades. Previous results were mainly taxonomic, genetic and physiological. Based on these highly valuable results and on the isolated yeast strains from Tokaj collected during previous research over the decades, we planned to carry out applied research with the aim of developing a multistarter yeast culture for local wineries, consisting of locally selected strains.

During the process of collecting data from field specific articles we have discovered the impressive work of Soós and Ásvány, which was extremely forward-looking and innovative for their era, more than a century ago. Fortunately for us, the Tokaj strains isolated by them have been preserved and made available to us by the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms. The study of these strains has enriched our work.

Soós and Ásvány (1950) recommended strains 10-1347 and 10-1358 as the best strains for inoculation for wine fermentation. In our own tests, these two strains also stood out from the others for their oenological properties. In trial fermentations, they were able to ferment wines of a quality that meets today's requirements. The outstanding performance of these strains in our experiments demonstrates that they have not lost their oenological properties during more than 10 decades of artificial strain culture. This confirms a previous theory that strains lose good fermentability during prolonged breeding and strain maintenance under non-selective conditions for improved fermentation performance.

Exciting phylogenetic relationships were discovered. The rDNA analysis clearly assigned all strains to *S. cerevisiae*, but their rDNA sequences were not identical and they were divided into two groups (type I and type II). The

concomitant presence of these differences may be a specific molecular marker of an indigenous (sub)population of *S. cerevisiae* wine yeast strains from the Central European geographical region. These strains appear to have been biotic components of the autochthonous yeast.

Based on the results mentioned at the beginning of this chapter, we know that the wine region is characterized by the presence of cryotolerant *S. uvarum* strains and that the osmotolerant and fructophilic species *C. zemplinina* has been isolated and described from the wine region. On the basis of these results, we considered that the yeast species *S. cerevisiae* could be a fortunate pairing with the two other species mentioned above in our multistarter culture. A total of 53 strains of the three species were analysed from a vinification point of view to select 1 strain from each of them, which were used for trial fermentations in 4 vintages.

In all vintages, the batches inoculated with our multistarter culture have fermented smoothly and dynamically. The sensory evaluation and the results of our classical and instrumental analytical tests show that the starter culture we have created has allowed us to ferment wines of excellent quality, safely and reproducibly.

We would like to pay tribute to the results achieved by Soós and Ásvány and will continue this exciting line of research, because the results presented in this thesis are only the first steps towards providing winemakers in the Tokaj Wine Region with an effective solution to improve the quality of their products. The development of special starter cultures for the fermentation of Tokaji wine specialities, late harvest sweet wines, which are extremely osmotic challenging, and aszú still awaits us.

## 9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Sipiczki Mátyás témavezetőmnek, hogy lehetőséget, teret és időt biztosított doktori munkám elvégzéséhez, valamint hasznos tanácsaival segítette és irányította munkámat. Köszönettel tartozom Gálné Dr. Miklós Idának a Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék Tanszékvezetőjének és valamennyi Munkatársának, valamint a Tokaji Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet Munkatársainak a segítségért. A Tokaj Kereskedőház Zrt. (ma Grand Tokaj Zrt.) vezetőségének, hogy teret engedtek a kísérleteinknek. Külön köszönöm Dr. Antunovics Zsuzsának a kariotipizálásokat, Dr. Pfliegler Walternek az ujjlenyomat módszerekben nyújtott segítségét, Kovács Anitának a technikusai támogatást és Dr. Oros Gyulának a statisztikában nyújtott támogatását. Továbbá Dr. Péter Gábornak a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményének a vezetőjének, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta a Tokaj törzseket.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Családomnak a kitartó támogatást.

## 10. Irodalom jegyzék

Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U., Kresovich, S., & Berg, D. E. (1992). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 20(19), 5137-5142.

Andreánszky, G. (1959). Die Flora der sarmatischen Stufe in Ungarn. Die paläoökologischen und zönologischen Beziehungen ihrer Entwicklungsgeschichte. Akadémiai Kiadó, Budapest.

Antunovics, Z., Irinyi, L., & Sipiczki, M. (2005). Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 971-979.

Antunovics, Z., Nguyen, H. V., Gaillardin, C., & Sipiczki, M. (2005). Gradual genome stabilisation by progressive reduction of the *Saccharomyces uvarum* genome in an interspecific hybrid with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 5, 1141-1150.

Balassa I.: Tokaj-Hegyalja szőleje és bora. (1991), Tokaj-Hegyaljai ÁG. Borkombinát, Tokaj.

Baleiras Couto, M. M., Eijnsma, B., Hofstra, H., Huis In't Veld, J. H., & Van der Vossen, J. M. (1996). Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 41-46.

Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1990). *Yeasts: characteristics and identification*. 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

Belarbi, M. A., & Lemaresquier, M. H. (1994). La caratterizzazione dei lieviti. *Vignevisini*, 21, 57-59.

Barnard, H., Dooley, A. N., Areshian, G., Gasparyan, B., & Faull, K. F. (2011). Chemical evidence for wine production around 4000 BCE in the Late

Chalcolithic Near Eastern highlands. *Journal of Archaeological Science*, 38, 977-984.

Bauer, F., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 27-51.

Bruns, T. D., White, T. J., & Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and systematics*, 22, 525-564.

Cameron, J. R., Loh, E. Y., & Davis, R. W. (1979). Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16, 739-751.

Charpentier, C., Colin, A., Alais, A., & Legras, J. L. (2009). French Jura flor yeasts: genotype and technological diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95, 263-273.

Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A., & Todd, B. E. N. T. (1997). Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian journal of grape and wine research*, 3, 2-8.

Csoma, H., & Sipiczki, M. (2008). Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8, 328-336.

Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P., & Sipiczki, M. (2010). Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: comparative genotypic and phenotypic analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 239-248.

Csoma, H., Ács-Szabó, L., Papp, L. A., & Sipiczki, M. (2018). Application of different markers and data-analysis tools to the examination of biodiversity can lead to different results: A case study with *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) strains. *FEMS Yeast Research*, 18, foy021.

Csoma, H., Kállai, Z., Antunovics, Z., Czentye, K., & Sipiczki, M. (2020). Vinification without *Saccharomyces*: Interacting osmotolerant and

“spoilage” yeast communities in fermenting and ageing botrytised high-sugar wines (Tokaj Essence). *Microorganisms*, 9, 19.

Coulon, J., Husnik, J. I., Inglis, D. L., van der Merwe, G. K., Lonvaud, A., Erasmus, D. J., & van Vuuren, H. J. (2006). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 113-124.

de Barros Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P. A., & Langridge, P. (1999). AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 915-924.

Daenen, L., Sterckx, F., Delvaux, F. R., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2008). Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Research*, 8, 1103-1114.

Defontaine, A., Lecocq, F. M., & Hallet, J. N. (1991). A rapid miniprep method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 19, 185.

Degre, R. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 4, 421-447.

De Sousa, H. R., Madeira-Lopes, A., & Spencer-Martins, I. (1995). The significance of active fructose transport and maximum temperature for growth in the taxonomy of *Saccharomyces sensu stricto*. *Systematic and Applied Microbiology*, 18, 44-51.

Dodd, E. (2020). Roman and late antique wine production in the Eastern Mediterranean: a comparative archaeological study at Antiochia ad Cragum (Turkey) and Delos (Greece). Archeopress, Oxford.

Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C. D., & Sabatelli, M. P. (2007). Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under

different process conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 281-289.

Egli, C. M., Edinger, W. D., Mittrakul, C. M., & Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 779-789.

Eperjesi, I., Kállay, M., & Magyar, I. (1998). *Borászat (Winery)*. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 329-337..

Fleet, G. H. (1993). Yeast-growth during fermentation. *Wine microbiology and biotechnology*, 27-54. CRC press.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22.

Fleet, G. H. (2007). Wine. *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers*, (Edn. 3), 863-890.

Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (Eds.). (2007). *Wine microbiology: practical applications and procedures*. Boston, MA: Springer US.

García-Ríos, E., Gutiérrez, A., Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., & Guillamon, J. M. (2014). The fitness advantage of commercial wine yeasts in relation to the nitrogen concentration, temperature, and ethanol content under microvinification conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 704-713.

Garcia-Vallvé, S., Palau, J., & Romeu, A. (1999). Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1125-1134.

Giudici, Caggia, Pulvirenti, & Rainieri. (1998). Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperature profiles. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 811-819.

Golden, D. A., Beuchat, L. R., & Hitchcock, H. L. (1994). Changes in fatty acid composition of various lipid components of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 293-303.

González, S. S., Barrio, E., Gafner, J., & Querol, A. (2006). Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 6, 1221-1234.

Gonzalez, R., Munoz, R., & Carrascosa, A. V. (2011). Production of wine starter cultures. *Molecular Wine Microbiology*, 279-302.

Gresham, D., Desai, M. M., Tucker, C. M., Jenq, H. T., Pai, D. A., Ward, A., & Dunham, M. J. (2008). The repertoire and dynamics of evolutionary adaptations to controlled nutrient-limited environments in yeast. *PLoS Genetics*, 4, e1000303.

Granek, J. A., & Magwene, P. M. (2010). Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genetics*, 6, e1000823.

Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T., & Querol, A. (1994). Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 708-714.

Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., & Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387-392.

Hanna, M., & Xiao, W. (2006). Isolation of nucleic acids. *Yeast Protocol*, 15-20.

Hansen, E. C. (1904). Grundlinien zur systematik der Saccharomyceten. Zentralblatt für Bakteriologie. Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. Zweite Abteilung, 12, 529-538.

Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 23-28.

Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536-553.

Hornsey, I. S. (2007). *The chemistry and biology of winemaking*. Royal Society of Chemistry. Cambridge.

James, S. A., Cai, J., Roberts, I. N., & Collins, M. D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47, 453-460.

Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215-237.

Kaneko, Y. and Banno, I. (1991). Reexamination of *Saccharomyces bayanus* strains by DNA-DNA hybridization and electrophoretic karyotyping. *Institute for Fermentation Osaka Research Communications*, 15, 30-40.

Karanyicz, E., Antunovics, Z., Kallai, Z., & Sipiczki, M. (2017). Non-introgressive genome chimerisation by malsegregation in autodiploidised allotetraploids during meiosis of *Saccharomyces kudriavzevii* x *Saccharomyces uvarum* hybrids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 4617-4633.

Kurtzman, C., Fell, J. W. (1998). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*, 3, 417-432.

Kreger-van Rij, N.J.W. 1984: The yeasts: a taxonomic study. 3rd edn. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

Legras, J. L., & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 249-255.

Legras, J. L., Erny, C., & Charpentier, C. (2014). Population structure and comparative genome hybridization of European flor yeast reveal a unique group of *Saccharomyces cerevisiae* strains with few gene duplications in their genome. *PloS one*, 9, e108089.

Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., & Angulo, L. (1996). Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 206-216.

Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 14539-14544

Lieckfeldt, E., Meyer, W., & Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, 33, 413-425.

Linderholm, A. L., Findleton, C. L., Kumar, G., Hong, Y., & Bisson, L. F. (2008). Identification of genes affecting hydrogen sulfide formation in

*Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1418-1427.

Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: a dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 856-873.

Lodder, J., & Kreger-van Rij, N. J. W. (1952). *The yeasts-a taxonomic study*. North-Holland Pub. Amsterdam. ISBN:0-444-80421-8

Lodder, J. (1970). General classification of the yeasts. *The yeasts, a taxonomic study*, 1-33.

Magyar, I. (2010) *Borászati Mikrobiológia - Borászat 3*. Mezőgazda Lap és Könyvkiadó Kft. Budapest. ISBN: 9789632865713

Magyar, I., & Bene, Zs. (2006). Morphological and taxonomic study on mycobiota of noble rotted grapes in the Tokaj wine district. *Acta Alimentaria*, 35, 237-246.

Mangado, A., Morales, P., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. (2018). Evolution of a yeast with industrial background under winemaking conditions leads to diploidization and chromosomal copy number variation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1816.

Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15, fov067.

Martini, A., & Martini, A. V. (1990). Grape must fermentation: past and present. In: Spencer, J.F.T. & Spencer, D.M. (eds). *Yeast technology*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 105 - 123.

Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., & Dubourdieu, D. (1998). New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3887-3892.

Master, O. I. V., & Patronage, O. I. V. (2023). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. International Organisation of Vine and Wine.

McCullough, M. J., Clemons, K. V., McCusker, J. H., & Stevens, D. A. (1998). Intergenic transcribed spacer PCR ribotyping for differentiation of *Saccharomyces* species and interspecific hybrids. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 1035-1038.

McGovern, P. E. (2013). *Ancient wine: the search for the origins of viniculture*. Princeton University Press.

McGovern, P., Jalabadze, M., Batiuk, S., Callahan, M. P., Smith, K. E., Hall, G. R., & Lordkipanidze, D. (2017). Early neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, E10309-E10318.

McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., ... & Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre-and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 17593-17598.

Minarik, E., & Laho, L. (1962). Die Hefen des Tokayer Weinbaugebietes. *Mitt. Klosterneuburg*, 12, 7-10.

Montrocher, R., Verner, M. C., Briolay, J., Gautier, C., & Marmeisse, R. (1998). Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48, 295-303.

Mortimer, R. K., & Johnston, J. R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*, 113, 35-43.

Müller-Thurgau, H. (1889). *Neue Forschungen auf dem Gebiete der Weingärung und deren Bedeutung für die Praxis*. Ber. Verhandl. xl Deut. Weinbaukongress in Trier, 80-100.

Morais, P. B., Hagler, A. N., Rosa, C. A., Mendonca-Hagler, L. C., & Klaczko, L. B. (1992). Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 1150–1155.

Nakao, Yoshihiro., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, Norihisa. & Ashikari, T. (2009). Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research*, 16, 115-129.

Naseeb, S., James, S. A., Alsammar, H., Michaels, C. J., Gini, B., Nueno-Palop, C., & Delneri, D. (2017). *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2046.

Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., ... & Ashikari, T. (2009). Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research*, 16, 115-129.

Naumova, E. S., Naumov, G. I., Masneuf-Pomarède, I., Aigle, M., & Dubourdieu, D. (2005). Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast*, 22, 1099-1115.

Naumov, G., Naumova, E., & Gaillardin, C. (1993). Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and Italy. *Systematic and Applied Microbiology*, 16, 274-279.

Naumov, G. I., Naumova, E. S., & Sniegowski, P. D. (1998). *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 1045-1050.

Naumov, G. I., Masneuf, I., Naumova, E. S., Aigle, M., & Dubourdieu, D. (2000) A. Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Research in Microbiology*, 151, 683-691.

Naumov, G. I., James, S. A., Naumova, E. S., Louis, E. J., & Roberts, I. N. (2000) B. Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1931-1942.

Naumov, G. I., Nguyen, H. V., Naumova, E. S., Michel, A., Aigle, M., & Gaillardin, C. (2001). Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 163-171.

Naumov, G. I., Naumova, E. S., Antunovics, Z., & Sipiczki, M. (2002). *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 727-730.

Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., & Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62, 89-94.

Nguyen, H. V., Lepingle, A., & Gaillardin, C. (2000). Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, 71-85.

Nguyen, H. V., & Gaillardin, C. (2005). Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. *FEMS Yeast Research*, 5(4-5), 471-483.

Nickerson, W. J. (1953). Reduction of inorganic substances by yeasts I. Extracellular reduction of sulfite by species of *Candida*. *The Journal of Infectious Diseases*, 43-56.

Oda, Y., Yabuki, M., Tonomura, K., & Fukunaga, M. (1997). A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S–28S rRNA spacer regions. *Yeast*, 13, 1243-1250.

O'Donnell, K. (1993). *Fusarium and its near relatives. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics.* CAB International, Wallingford, 225-233.

OIV 332A. OIV Standard for International Wine and Spirituous Beverages of Vitivincultural Origin Competitions. 2009.

Özcan, S., & Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 554-569.

Paffetti, D., Barberio, C., Casalone, E., Cavalieri, D., Fani, R., Fia, G., ... & Polsinelli, M. (1995). DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism is useful for yeast typing. *Research in Microbiology*, 146, 587-594.

Piotrowski, J. S., Nagarajan, S., Kroll, E., Stanbery, A., Chiotti, K. E., Kruckeberg, A. L., ... & Rosenzweig, F. (2012). Different selective pressures lead to different genomic outcomes as newly-formed hybrid yeasts evolve. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 1-17.

Pfliegler, W. P., Horváth, E., Kállai, Z., & Sipiczki, M. (2014). Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis. *Microbiological Research*, 169, 402-410.

Pfliegler, W. P., & Sipiczki, M. (2016). Does fingerprinting truly represent the diversity of wine yeasts? A case study with interdelta genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 63, 406-411.

Pizarro, F., Vargas, F. A., & Agosin, E. (2007). A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast*, 24, 977-991.

Pronk, J. T., Yde Steensma, H., & Van Dijken, J. P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1607-1633.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramón, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2948-2953.

Rainieri, S., & Pretorius, I. S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of microbiology*, 50, 15-32.

Redzepović, S., Orlić, S., Sikora, S., Majdak, A., & Pretorius, I. S. (2002). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 305-310.

Regodón, J. A., Pérez, F., Valdés, M. E., De Miguel, C., & Ramirez, M. (1997). A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology*, 14, 247-254.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications (Vol. 1)*. John Wiley & Sons.

Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., & Zironi, R. (1992). Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 73, 126-130.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169-180.

Ryu, S. L., Murooka, Y., & Kaneko, Y. (1996). Genomic reorganization between two sibling yeast species, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 757-764.

Schlenk, F. (1985). Early research on fermentation — a story of missed opportunities. *Trends in Biochemical Sciences*, 10, 252-254.

Schütz, M., & Gafner, J. (1993). Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 75, 551-558.

Sipiczki, M. (2003). *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 2079-2083.

Sipiczki, M. (2004). Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 44, 471-479.

Sipiczki, M. (2011). Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome—a review. *Annals of Microbiology*, 61, 85-93.

Sipiczki, M., & Ferenczy, L. (1977). Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Molecular and General Genetics MGG*, 151, 77-81.

Sipiczki, M., Romano, P., Lipani, G., Miklos, I., & Antunovics, Z. (2001). Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 97-105.

Soós I., Ásvány Á., (1950). A magyar borélesztők morfológiai és fiziológiai vizsgálata Az Ampelológiai Kutatóintézet Évkönyve. 10: 255-290. Budapest

Soós I. (1948). *Borbakterológia*. Szerző kiadása, Budapest

Suh, S. O., Blackwell, M., Kurtzman, C. P., & Lachance, M. A. (2006). Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98, 1006-1017.

Stamenova, R., Dimitrov, M., Stoycheva, T., Pesheva, M., Venkov, P., & Tsvetkov, T. S. (2008). Transposition of *Saccharomyces cerevisiae* Ty1

retrotransposon is activated by improper cryopreservation. *Cryobiology*, 56, 241-247.

Stur, D. R. J. (1867). Beitrage zur Kenntniss der Flora, der Susswasserquarze, der Congerien-und Cerithien-Schichten im Wiener und ungarischen Becken. *Jahrbuch der Geologischen Bundesanstalt* 017: 77 - 188.

Sváb, J. (1979). *Multivariate methods in biometrics*. Mezogazdasagi Kiado, Budapest.

Tofalo, R., Chaves-López, C., Di Fabio, F., Schirone, M., Felis, G. E., Torriani, S., ... & Suzzi, G. (2009). Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 179-187.

Tofalo, R., Schirone, M., Torriani, S., Rantsiou, K., Cocolin, L., Perpetuini, G., & Suzzi, G. (2012). Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. *Food Microbiology*, 29, 18-26.

Valente, P., Gouveia, F. C., de Lemos, G. A., Pimentel, D., van Elsas, J. D., Mendonça-Hagler, L. C., & Hagler, A. N. (1996). PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 137, 253-256.

Van der Walt, J. P. (1970). The genus *Saccharomyces* (Meyen) Reess. The yeasts, a taxonomic study, 555-718.

Vaughan Martini, A. N. N., & Kurtzman, C. P. (1985). Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35, 508-511.

Vaughan Martini, A., & Martini, A. (1987). Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 77-84.

Vaughan-Martini, A., & Martini, A. (2011). *Saccharomyces meyen ex reess* (1870). In *The Yeasts* (pp. 733-746). Elsevier.

Vinicius De Melo Pereira, G., De Carvalho Neto, D. P., Junqueira, A. C. D. O., Karp, S. G., Letti, L. A. J., Magalhães Júnior, A. I., & Socol, C. R. (2020). A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. *Food Reviews International*, 36, 135–167.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, 18, 315-322.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.

Woods, D. R., & Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 5, 115-126.

World Heritage Committee (2002) Decisions adopted by 26th session of the World Heritage Committee, WHC-02/CONF.202/INF.15. pp 61–62

Yamada, Y. (1993). Reidentification of 121 strains of the genus *Saccharomyces*. *Bull Jpn Fed Cult Coll*, 9, 95-119.

Yamamoto, N., Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K., & Totsuka, A. (1991). Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 358-363.

Yarrow, D. (1998). Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In *The yeasts* (pp. 77-100). Elsevier.

Zelenák István (2012) *A tokaji aszú titkai*. Agroinform kiadó. Budapest.

## 11. Mellékletek

1. táblázat: A Tokaj törzsek sejt morfológiája és mérete (n=10).

Törzs	sejtmorfológia		hosszabb oldal	rövidebb oldal
			$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$
10-1343 (T1)	ovális	kis sejt	$4,7\pm 0,4$	$3,7\pm 0,4$
		nagy sejt	$6,6\pm 0,2$	$5,1\pm 0,4$
10-1344 (T2)	hosszúkás		$13,7\pm 1,9$	$4,1\pm 0,2$
	ovális		$5,4\pm 0,3$	$4,0\pm 0,2$
10-1345 (T4)		gömbölyű	$4,9\pm 0,5$	$5,3\pm 0,5$
10-1346 (T5)	ovális	kis sejt	$4,4\pm 0,1$	$3,6\pm 0,1$
		nagy sejt	$6,8\pm 0,4$	$5,7\pm 0,2$
10-1347 (T7)		gömbölyű	$6,1\pm 0,2$	$6,1\pm 0,4$
10-1348 (T8)		ovális	$7,8\pm 0,4$	$6,3\pm 0,3$
10-1349 (T9)		gömbölyű	$5,4\pm 0,3$	$5,2\pm 0,1$
10-1350 (T10)		ovális	$6,2\pm 0,1$	$5,0\pm 0,3$
10-1351 (T11)		ovális	$6,6\pm 0,5$	$5,1\pm 0,4$
10-1352 (T12)		ovális	$8,4\pm 0,6$	$5,8\pm 0,7$
10-1353 (T13)		ovális	$5,6\pm 0,2$	$5,3\pm 0,1$
10-1354 (T15)		ovális	$7,6\pm 0,4$	$4,8\pm 0,2$
10-1355 (T18)		ovális	$7,7\pm 0,1$	$5,1\pm 0,6$
10-1356 (T19)		ovális	$6,8\pm 0,3$	$4,7\pm 0,5$
10-1357 (T21)		ovális	$6,8\pm 0,5$	$5,2\pm 0,3$
10-1358 (T22)		ovális	$6,2\pm 0,4$	$4,3\pm 0,2$
10-1359		ovális	$7,2\pm 0,5$	$5,5\pm 0,7$

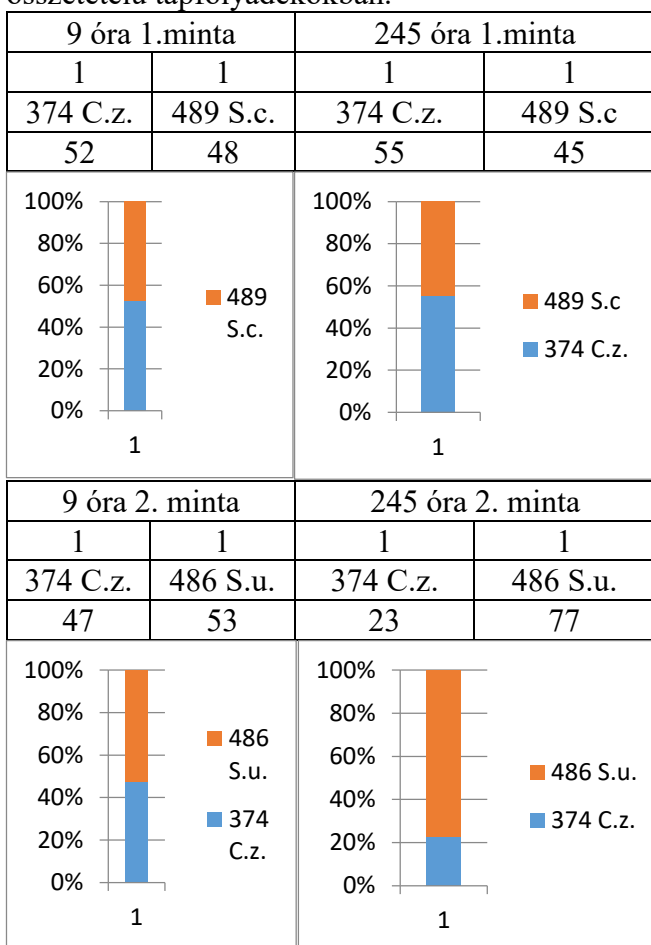
2. táblázat: A Tokaj törzsek szekvenciáinak akkcessziós számai.

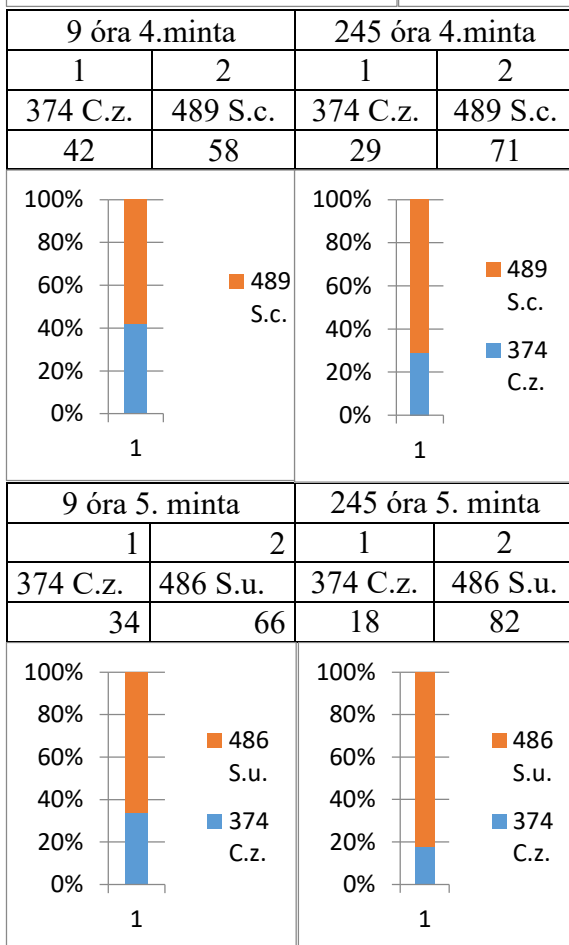
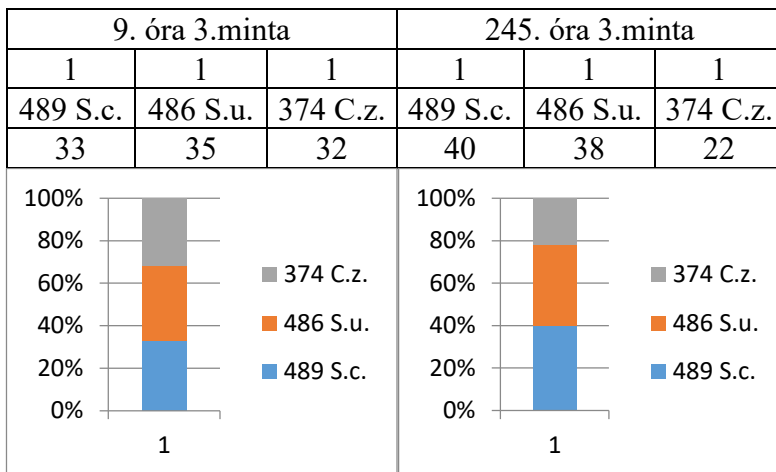
Azonosító	Akkcessziós szám		Egyezés % a CBS 1175 <i>S. cerevisiae</i> ITS1-5.8S-ITS2 szekvenciájával (KY105073.1)
	D1/D2	ITS1-5.8S-ITS2	
10-1343 (T1)	KF560467	MF150087	99,25
10-1344 (T2)	KF560468	MF150088	99,50
10-1345 (T4)	KF560469	MF150089	98,76
10-1346 (T5)	MF062690		
10-1347 (T7)	KF560470		
10-1348 (T8)	KF560471	MF169657	98,76
10-1349 (T9)	KF560472	MF169658	98,76
10-1350 (T10)	KF560473		
10-1351 (T11)	KF582940		
10-1352 (T12)	KF582939		
10-1353 (T13)	KF582938	MF169659	99,25
10-1354 (T15)	KF582937	MF276987	99,25
10-1355 (T18)	KF582936	MF276988	99,25
10-1356 (T19)	MF062691	MF276989	99,13
10-1357 (T21)	MF062692	MF375632	99,50
10-1358 (T22)	MF078469	MF375633	99,37
10-1359	MF078470	MF375634	99,13

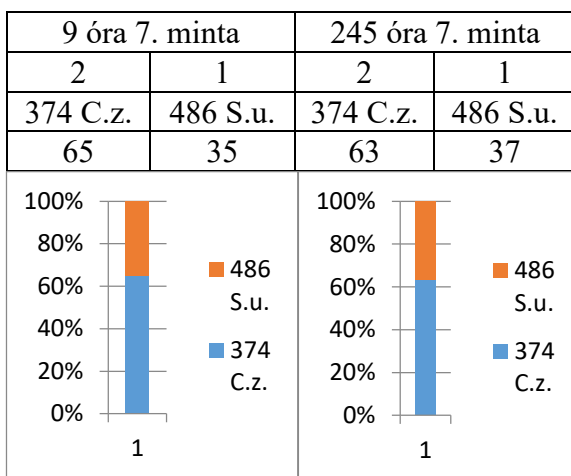
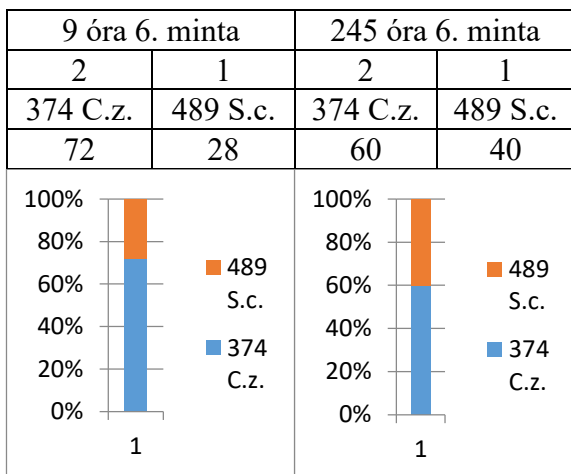
1. ábra: Példa az ozmotolerancia és az asszimilációs vizsgálatok gyenge (W) növekedésére. Bal oldali telep +, jobb oldali gyenge (W)

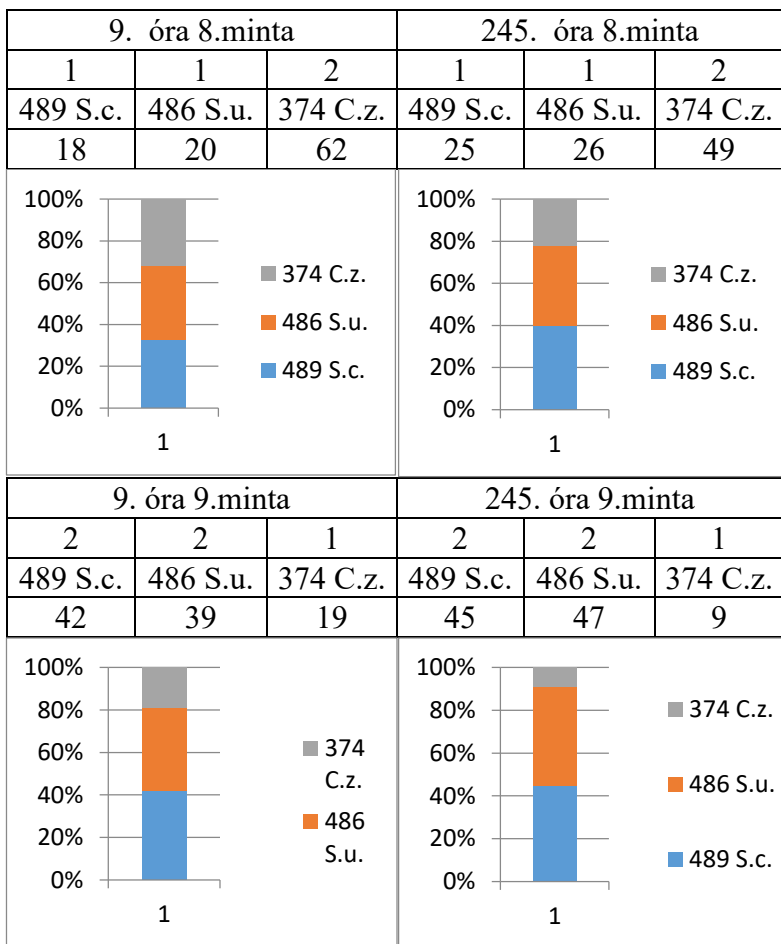


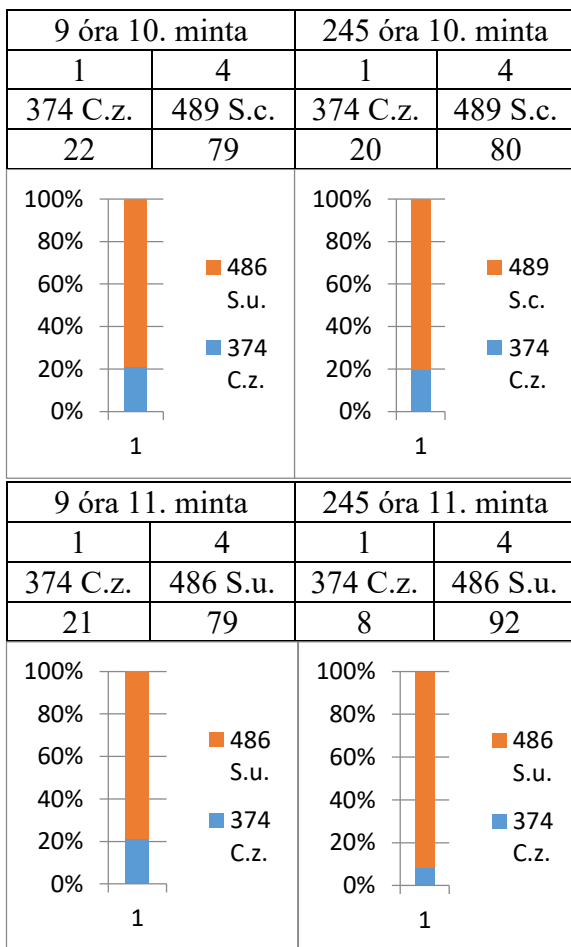
2. ábra: A *C. zemplinina* 10-374 törzsének versenyképességének vizsgálata a *S. cerevisiae* 10-489 és *S. uvarum* 10-486 törzsekkel szemben különböző összetételű tápfolyadékokban.

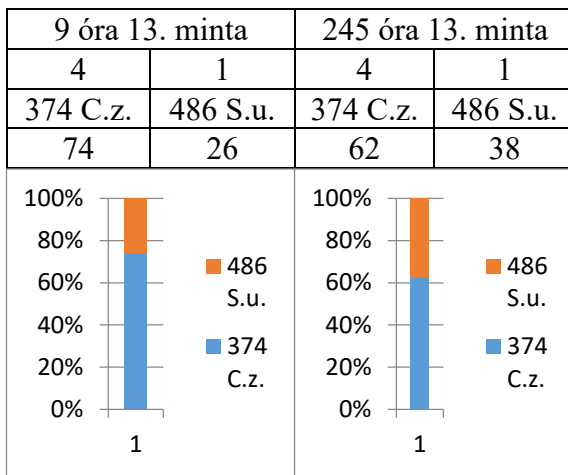
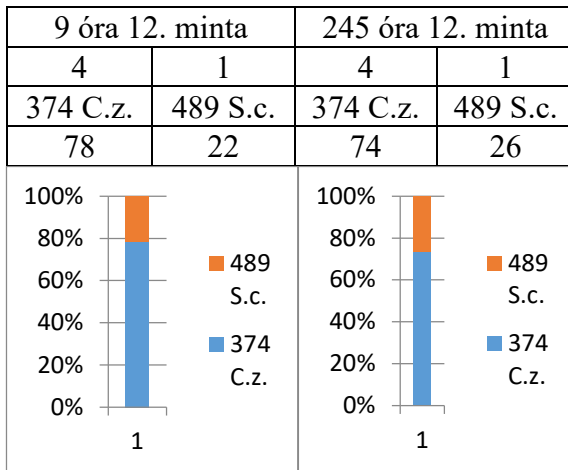


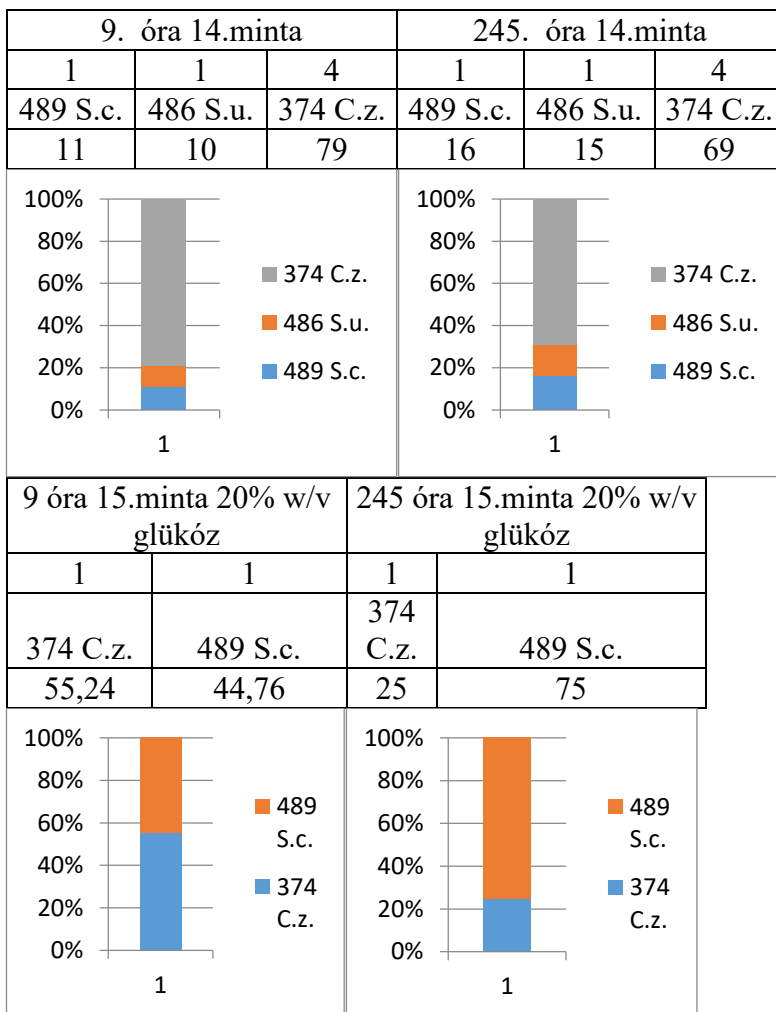


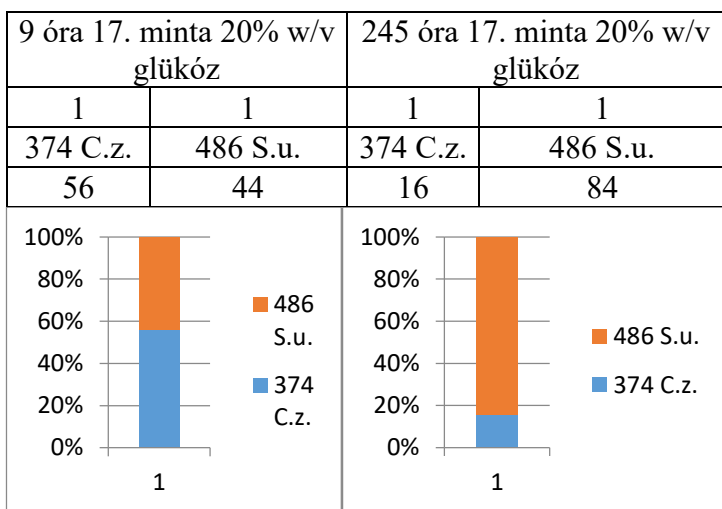
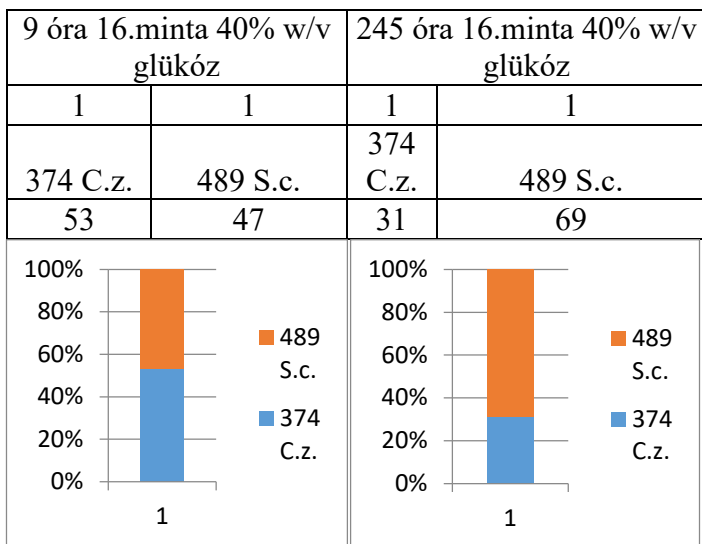


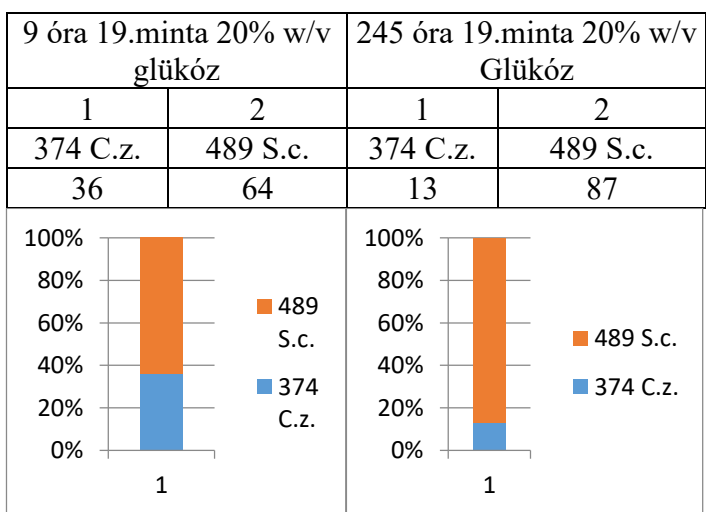
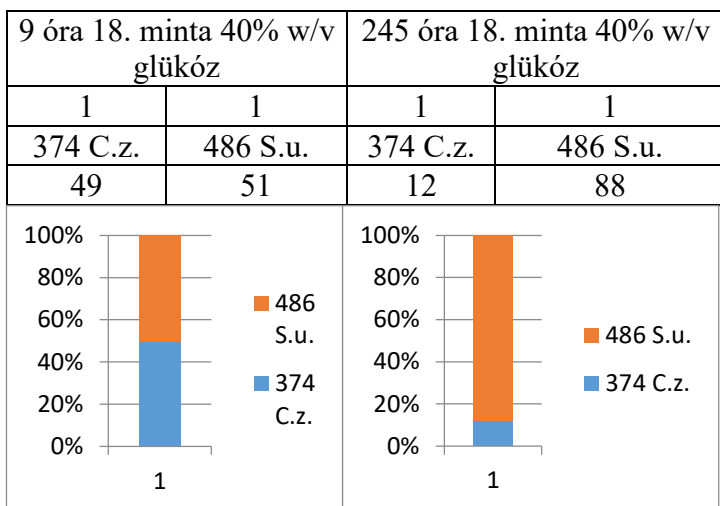




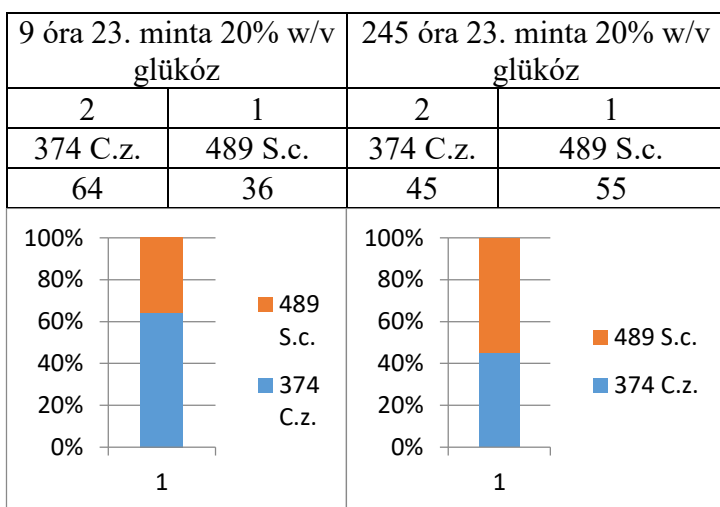
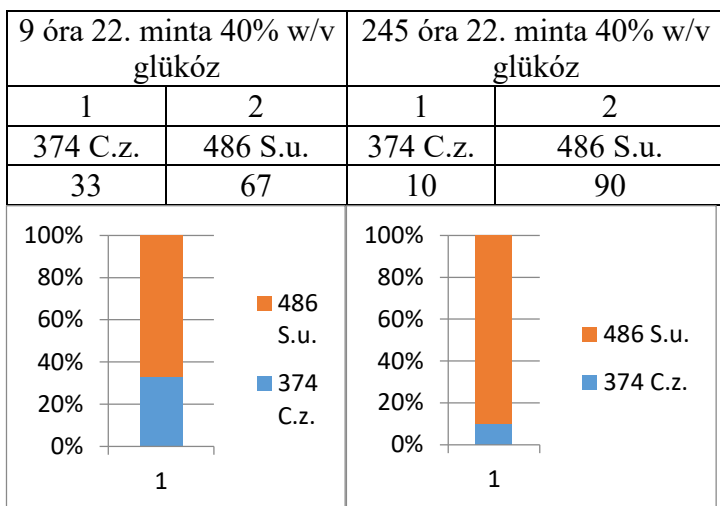


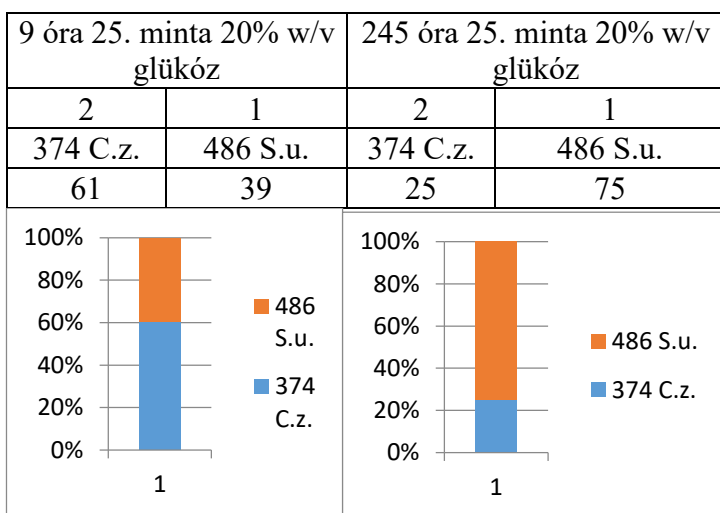
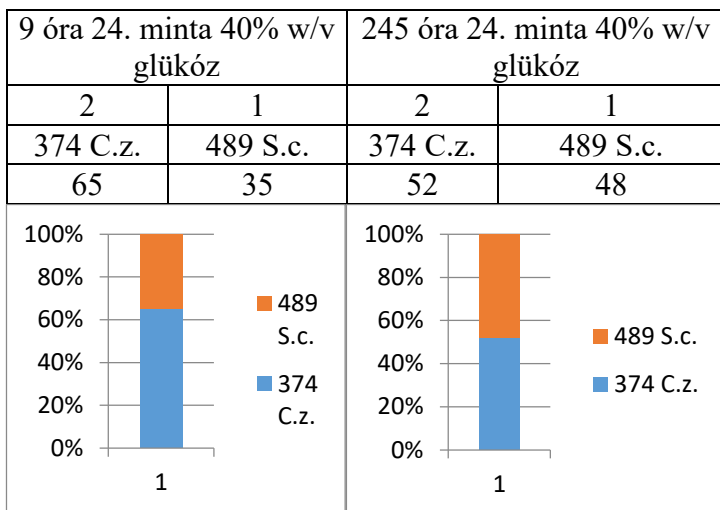






9 óra 20.minta 40% w/v glükóz		245 óra 20.minta 40% w/v glükóz	
1	2	1	2
374 C.z.	489 S.c.	374 C.z.	489 S.c.
39	61	23	77
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.c. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.c. 374 C.z.</p>	
9 óra 21. minta 20% w/v glükóz		245 óra 21. minta 20% w/v glükóz	
1	2	1	2
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
34	66	4	96
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>	





9 óra 26. minta 40% w/v glükóz		245 óra 26. minta 40% w/v glükóz	
2	1	2	1
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
64	36	25	75
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>	
9 óra 27. minta 20% w/v glükóz		245 óra 27. minta 20% w/v glükóz	
1	4	1	4
374 C.z.	489 S.c.	374 C.z.	489 S.c.
22	78	15	85
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.c. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.c. 374 C.z.</p>	

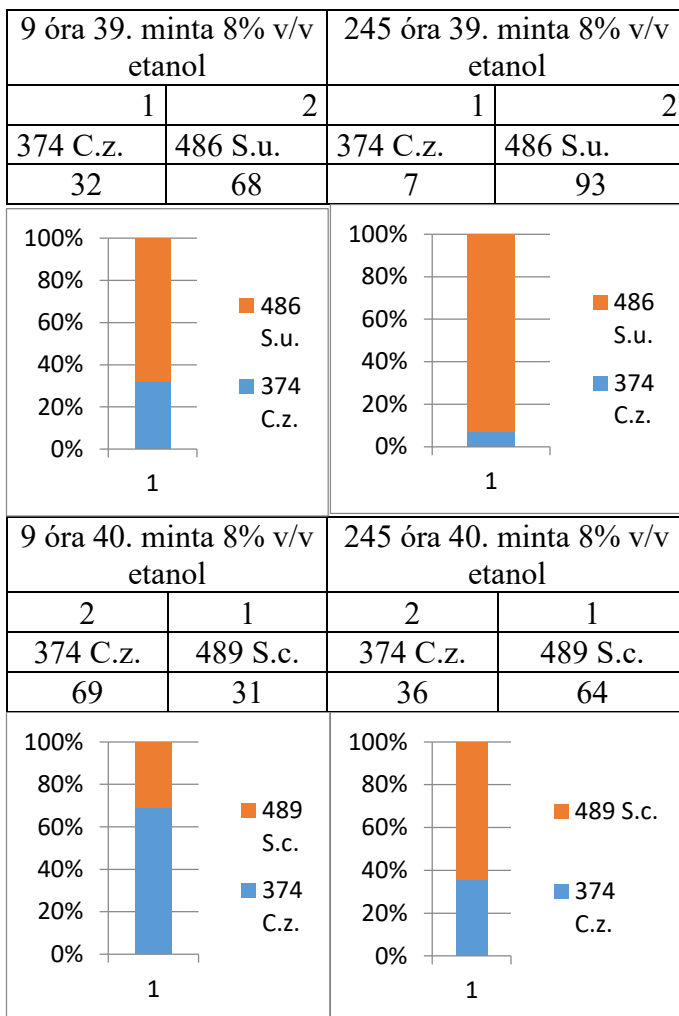
9 óra 28. minta 40% w/v glükóz		245 óra 28. minta 40% w/v glükóz	
1	4	1	4
374 C.z.	489 S.c.	374 C.z.	489 S.c.
24	76	13	87
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.c. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.c. 374 C.z.</p>	
9 óra 29. minta 20% w/v glükóz		245 óra 29. minta 20% w/v glükóz	
1	4	1	4
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
19	81	2	98
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>	

9 óra 30. minta 40% w/v glükóz		245 óra 30. minta 40% w/v glükóz	
1	4	1	4
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
25	75	4	96
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>	
9 óra 31. minta 20% w/v glükóz		245 óra 31. minta 20% w/v glükóz	
4	1	4	1
374 C.z.	489 S.C.	374 C.z.	489 S.C.
78	22	59	41
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.C. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.C. 374 C.z.</p>	

9 óra 32. minta 40% w/v glükóz		245 óra 32. minta 40% w/v glükóz	
4	1	4	1
374 C.z.	489 S.C.	374 C.z.	489 S.C.
82	18	70	30
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.C. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.C. 374 C.z.</p>	
9 óra 33. minta 20% w/v glükóz		245 óra 33. minta 20% w/v glükóz	
4	1	4	1
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
76	24	37	63
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>	

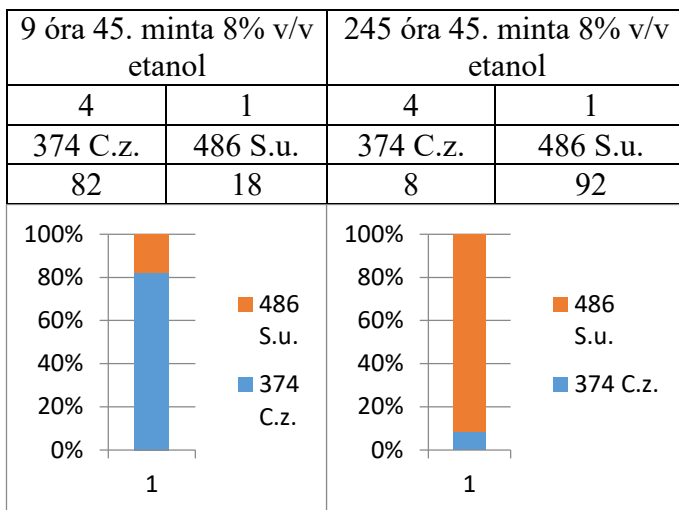
9 óra 34. minta 40% w/v glükóz		245 óra 34. minta 40% w/v glükóz	
4	1	4	1
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
82	18	44	56
9 óra 35.minta 8% v/v etanol		245 óra 35.minta 8% v/v etanol	
1	1	1	1
374 C.z.	489 S.c.	374 C.z.	489 S.c.
48	52	24	76

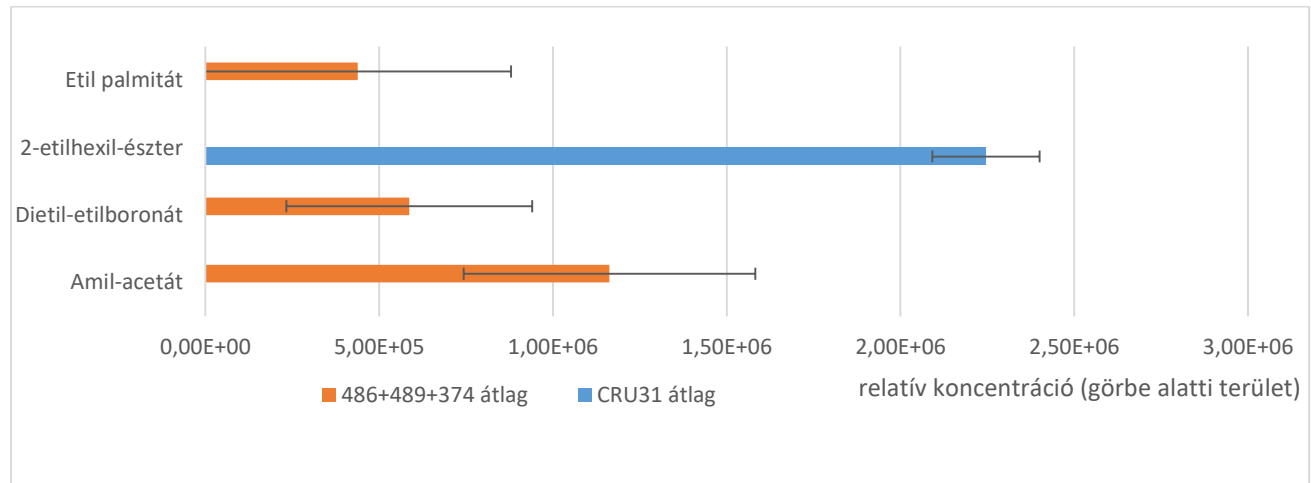
9 óra 36. minta 8% v/v etanol		245 óra 36. minta 8% v/v etanol	
1	1	1	1
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
55	45	17	83
9 óra 38.minta 8% v/v etanol		245 óra 38.minta 8% v/v etanol	
1	2	1	2
374 C.z.	489 S.c.	374 C.z.	489 S.c.
27	73	25	75



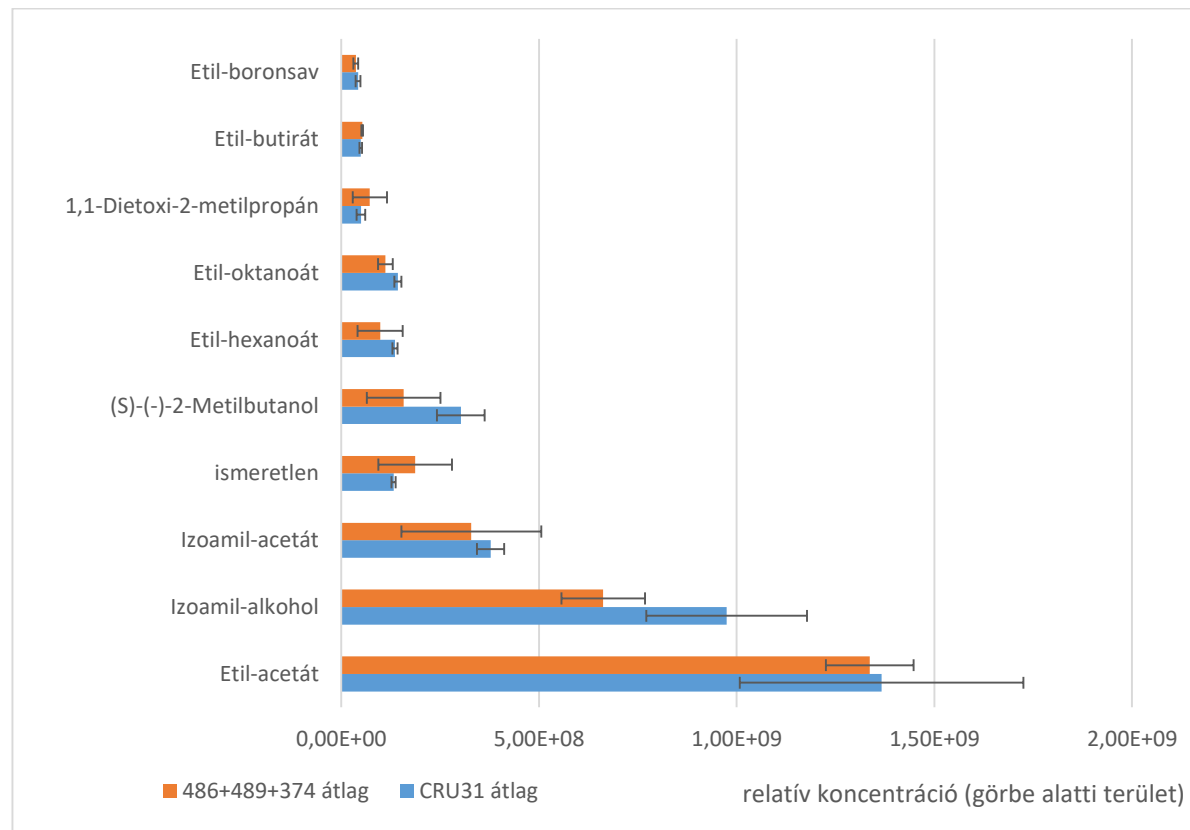
9 óra 41. minta 8% v/v etanol		245 óra 41. minta 8% v/v etanol	
2	1	2	1
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
68	32	13	87
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>	
9 óra 42. minta 8% v/v etanol		245 óra 42. minta 8% v/v etanol	
1	4	1	4
374 C.z.	489 S.c.	374 C.z.	489 S.c.
23	77	10	90
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.c. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.c. 374 C.z.</p>	

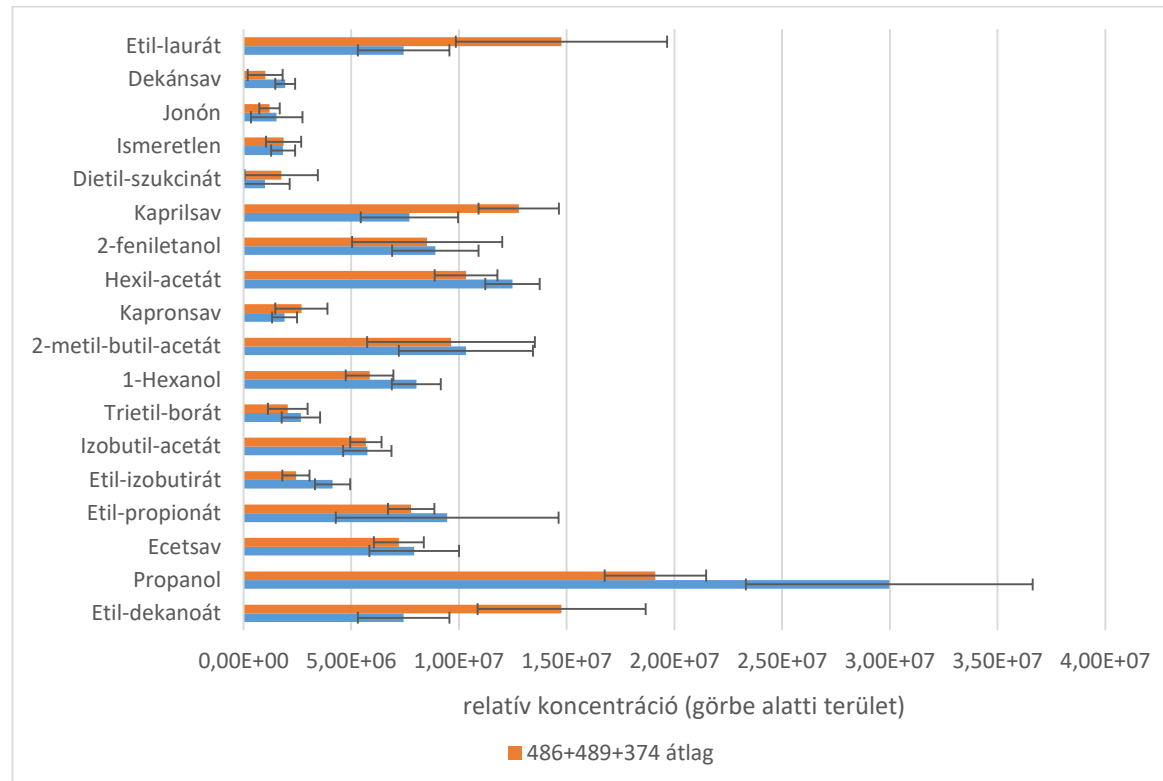
9 óra 43. minta 8% v/v etanol		245 óra 43. minta 8% v/v etanol	
1	4	1	4
374 C.z.	486 S.u.	374 C.z.	486 S.u.
19	81	5	98
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>486 S.u. 374 C.z.</p>	
9 óra 44. minta 8% v/v etanol		245 óra 44. minta 8% v/v etanol	
4	1	4	1
374 C.z.	489 S.C.	374 C.z.	489 S.C.
79	21	42	58
<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.C. 374 C.z.</p>		<p>100% 80% 60% 40% 20% 0%</p> <p>1</p> <p>489 S.C. 374 C.z.</p>	





3, 4 és 5. ábra: Az aromakomponensek relatív koncentrációja a kereskedelmi starterkultúrával (CRU31) és a saját multistarter kultúrákkal erjesztett borokban CRU31: n=4, 486+489+374: n=5





## 12. Tudományos közlemények jegyzéke:



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/339/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kállai Zoltán  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10048427

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Kállai, Z.**, Oros, G.: Vintage Effect on the Strain Dependent Dynamics of Ethanol Production in Vineries of Tokaj.  
*Adv. Bios. Bio.* 12 (01), 31-44, 2021. ISSN: 2156-8456.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2021.121003>
2. **Kállai, Z.**, Pfliegler, V. P., Mitercsák, J., Szendei, G., Sipiczki, M.: Preservation of diversity and oenological properties of wine yeasts during long-term laboratory maintenance: A study of strains of a century-old Tokaj wine yeast collection.  
*LWT-Food Sci. Technol.* 101, 789-798, 2019. ISSN: 0023-6438.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.002>  
IF: 4.006
3. Pfliegler, V. P., Horváth, E., **Kállai, Z.**, Sipiczki, M.: Diversity of *Candida zemplinina* isolates inferred from RAPD, micro/minisatellite and physiological analysis.  
*Microbiol. Res.* 169 (5-6), 402-410, 2014. ISSN: 0944-5013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.006>  
IF: 2.561





### További közlemények

#### Magyar nyelvű könyvek (2)

4. Rakonczás, N., **Kállai, Z.**: Terroir - A hagyomány forradalma I. Technológiai megközelítés Agyag, ásvány, mineralitás, a bentonitos derítés hatása. Szaktudás Kiadó Ház Rt., Budapest, 18 p., 2022. ISBN: 9789635750801
5. Rakonczás, N., **Kállai, Z.**: Terroir - A hagyomány forradalma II. Szakrális megfontolás. Szaktudás Kiadó Ház Rt., Budapest, 12 p., 2022. ISBN: 9789635750917

#### Idegen nyelvű, külföldi könyvrészletek (1)

6. Oros, G., **Kállai, Z.**: Phytoanticipins: the Constitutive Defense Compounds as Potential Botanical Fungicides.  
In: Bioactive Molecules in Plant Defense Signaling in Growth and Stress. Eds.: Sudisha Jogaiah, Mostafa Abdelrahman, Springer Nature, Cham, 179-229, 2019. ISBN: 9783030271640

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (12)

7. Gálné Remenyik, J., Csige, L., Dávid, P., Fauszt, P., Szilágyi-Rácz, A. A., Szöllösi, E., Bacsó, Z. R., Szepsy, I., Molnár, K., Rácz, C., Fidler, G., **Kállai, Z.**, Stündl, L., Dobos, A., Paholcsek, M.: Exploring the interplay between the core microbiota, physicochemical factors, agrobiological cycles in the soil of the historic tokaj mád wine region.  
*PLoS One*. 19 (4), 1-24, 2024. ISSN: 1932-6203.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0300563>  
IF: 3.7 (2022)
8. Sipiczki, M., Czentye, K., **Kállai, Z.**: High intragenomic, intergenomic, and phenotypic diversity in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeasts indicates a special mode of genome evolution.  
*Sci. Rep.* 14 (1), 1-13, 2024. EISSN: 2045-2322.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-61335-5>  
IF: 4.6 (2022)
9. Csoma, H., Ács-Szabó, L., Papp, L. A., **Kállai, Z.**, Miklós, I., Sipiczki, M.: Characterization of *Zygosaccharomyces lentus* Yeast in Hungarian Botrytized Wines.  
*Microorganisms*. 11 (4), 1-17, 2023. EISSN: 2076-2607.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11040852>  
IF: 4.5 (2022)





10. Rakonczás, N., **Kállai, Z.**, Kovács, B., Antal, G., Szabó, S., Holb, I.: Comparison and Intercorrelation of Various Bentonite Products for Oenological Properties, Elemental Compositions, Volatile Compounds and Organoleptic Attributes of White Wine. *Foods*. 12 (2), 1-30, 2023. EISSN: 2304-8158.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/foods12020355>  
IF: 5.2 (2022)
11. Csoma, H., **Kállai, Z.**, Czentye, K., Sipiczki, M.: *Starmerella lactis-condensi*, a yeast that has adapted to the conditions in the oenological environment. *Int. J. Food. Microbiol.* 401 (1), 1-10, 2023. ISSN: 0168-1605.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110282>  
IF: 5.4 (2022)
12. Drezek, K., Sobczyk, M. K., **Kállai, Z.**, Detman, A., Bardadyn, P., Mierzejewska, J.: Valorisation of Whey Permeate in Sequential Bioprocesses towards Value-Added Products? Optimisation of Biphasic and Classical Batch Cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (8), 1-17, 2023. EISSN: 1422-0067.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24087560>  
IF: 5.6 (2022)
13. Csoma, H., **Kállai, Z.**, Antunovics, Z., Czentye, K., Sipiczki, M.: Vinification without *Saccharomyces*: Interacting Osmotolerant and "Spoilage" Yeast Communities in Fermenting and Ageing Botrytised High-Sugar Wines (Tokaj Essence). *Microorganisms*. 9 (1), 1-28, 2021. EISSN: 2076-2607.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9010019>  
IF: 4.926
14. **Kállai, Z.**, Antunovics, Z., Oros, G.: Comparative Evaluation of the Dynamics of Alcohol Production of Wine Yeast Strains Isolated in Tokaj Region. *Glob. J. Sci. Front. Res.* 20 (6), 1-22, 2020. ISSN: 0975-5896.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.34257/GJSFRDVOL20IS6PG1>
15. Rakonczás, N., Juhászné Tóth, R., Soós, Á., **Kállai, Z.**, Kovács, B., Holb, I., Kovács, S.: Could bentonite product choice fit the desired wine style? *Mitteilungen Klosterneuburg*. 70, 87-101, 2020. ISSN: 0007-5922.  
IF: 0.571
16. Plaszkó, T., Szűcs, Z., **Kállai, Z.**, Csoma, H., Vasas, G., Gonda, S.: Volatile Organic Compounds (VOCs) of Endophytic Fungi Growing on Extracts of the Host, Horseradish (*Armoracia rusticana*). *Metabolites*. 10 (11), 1-15, 2020. EISSN: 2218-1989.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/metabo10110451>  
IF: 4.932





17. Karanyicz, E., Antunovics, Z., **Kállai, Z.**, Sipiczki, M.: Non-introgressive genome chimerisation by malsegregation in autodiploidised allotetraploids during meiosis of *Saccharomyces kudriavzevii* x *Saccharomyces uvarum* hybrids.  
*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (11), 4617-4633, 2017. ISSN: 0175-7598.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8274-9>  
IF: 3.34
18. Magyar, D., **Kállai, Z.**, Sipiczki, M., Dobolyi, C., Sebők, F., Beregszászi, T., Bihari, Z., Kredics, L., Oros, G.: Survey of viable airborne fungi in wine cellars of Tokaj, Hungary.  
*Aerobiologia.* 34 (2), 171-185, 2017. ISSN: 0393-5965.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10453-017-9505-3>  
IF: 1.515

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 50,851**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
6,567**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.06.05.

