

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Borászati starterkultúra fejlesztés a Tokaji borvidéken

Kállai Zoltán

Témavezető: Dr. Sipiczki Mátyás



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2024

1. Célkitűzés

1: Célunk volt 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 kierjesztésére, esetleg borászati starterkulturaként felhasználhatóak-e?

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

2. Irodalmi áttekintés

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 szelektív 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*, *Torulaspora* 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 színstabilitást 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 tisztatenyészetével, 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).

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 eszközeinek tekinthetők. Amellett, hogy az élesztő elsődleges szerepet tölt be a glükóz és fruktóz hatékony átalakításában alkoholra 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 fajlesztőkkel szemben támasztott követelmények (Magyar 2010, Degre 1993, Rainieri 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 szulfid leköttető 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:
 - neutrális erjedési aromaképzés
 - 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 starterkultúráknak (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 dülőnek és pincészetnek egyedileg megfelelő törzsek szelektálására és starterkultúrává nemesítésére.

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

3. Módszerek

A törzsek molekuláris taxonómiai meghatározása

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

A pontos molekuláris taxonómiai meghatározáshoz két konzervatív régiónak, az ITS1-5.8S rRNS-ITS4 és a 26S rRNS nagy alegység (LSU) D1/D2 doménjét kódoló régióknak a szekvencia analízisét használtuk fel. (White és Mtsi., 1990) (O'Donnell, 1993)

A kapott PCR termékek Microsynth cég bécsi laboratóriumába küldtük szekvenálásra. 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 típus törzsének szekvenciájával, amit a CBS adatbázisból töltöttünk le (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database>).

PCR-ujjlenyomat módszerek

Az alábbi RAPD és mikroszatellit primereket használtuk:

primer 24 (Baleiras Couto Mtsi., 1996), primer RF2 (Paffetti és Mtsi., 1995), és (GTG)₅ ((Lieckfeldt és Mtsi., 1993), 1283 (Akopyanz et al., 1992). Az interdelta genotipizálást (δ -PCR) Legras és Karst (2003) protokollja alapján kivitelezttük. δ -

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

A sávmintázatokból bináris mátrixot hoztunk létre, amiből távolságmátrixot számoltunk a Dice koefficiens alapján, majd az UPGMA algoritmussal dendrogramot készítettünk a <http://genomes.urv.es/UPGMA/> szolgáltatás (Garcia-Vallvé és Mtsi., 1999) felhasználásával. A két interdelta és a három RAPD/mikroszatellita analízis eredményeit kombináltuk, hogy két még részletesebb dendrogramot kapjunk.

Elektroforetikus kariotipizálás

A kariotipizálást Karanyicz és Mtsi., 2017 protokollja alapján végeztük el.

Vizsgáltuk a kromoszómákat képviselő sávok számát és méretét. A törzsek kariotípusait UPGMA analízissel hasonlítottuk össze .

Mitokondriális DNS (mtDNS) kivonása és restriktív analízise.

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

A kapott fragmenseket 0,7% w/v-os agarózgélben 0,5x TBE-ben választottuk el, majd transziluminátorban vizualizáltuk.

A törzsek fiziológiai vizsgálata

Makro- és mikromorfológiai vizsgálatok

A makromorfológiai vizsgálatok során megfigyeltük a vizsgált élesztőtelepek formáját, nagyságát, színét, állagát, felszínét, struktúráját és körvonalát. A mikromorfológiai vizsgálat során megfigyeltük az élesztősejtek méretét, alakját, sarjképzését fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálattal 400X nagyításon.

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 asszimilációs vizsgálatok által megállapíthatjuk, hogy az izolált, különböző élesztőtörzsek anyagcsere folyamataik során milyen szén- és nitrogénforrást képesek felhasználni.

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.

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 törzsek kénhidrogén termelő képességét Linderholm (Linderholm és Mtsi, 2008) módszere alapján is meghatároztuk fermentációs körülmények között.

A törzsek savtermelő képessége

A törzsek savtermelési képességét Custer féle krétás agaron vizsgáltuk meg (Belarbi és Lemaesquier, 1994). Vizsgáltuk a savtermelés esetében képződött feloldási zónát.

Killer aktivitás vizsgálata

A killer aktivitást Woods és Bevan (1968) publikációja szerint vizsgáltuk.

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.

A *C. zemplinina* versenyképességének vizsgálata a kevert starterkultúrákban

A vizsgálathoz módosított YPL tápfolyadékokat készítettünk, melyekben 20% w/v és 40% w/v glükóz tartalmat, valamint 8v/v% etanol végkoncentrációt és különböző leoltási arányokat állítottunk be. A fajok elkülönítését a sejtek mérete alapján végeztük. 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.

Mikrovinifikációs kísérletek

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) 5×10^6 sejt 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.

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 kiejedt borok alkohol-, cukor-, sav-, illósav tartalmát és pH értékét.

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 végeztük 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.

Félüzemi erjesztési kísérletek a multistarter fejlesztéséhez:

Az erjesztési kísérleteket 2010 és 2011 évben a Tokaj Kereskedőház Zrt. borászati üzemében, 2012 évben a Tokaji Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben végeztük el. A 2012-ben kiejedt borokat 100 pontos bírálati rendszerben értékeltük. 2013-ban a Majoros pincészetnél állítottuk be az erjesztési kísérletet fahordókban.

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 sejtuszpenziók 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.

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.

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-, glicerín-, ecetsav-, és alkohol koncentráció Bruker Alpha FTIR spektrométer (Bruker Optic GmbH, Germany) alkalmazásával került meghatározásra.

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 kapcsoltunk. 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.

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. 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.

4. Eredmények és megbeszélésük

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 törzsétől. 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 éveitől (1901-1906) és a két Szlovákiai törzs izolálásán 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 a közép-európai borászatokból származó elterjedésnek tulajdonítható. A II-típusú törzsek ITS szekvenciájának 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 kevésbé konzervált molekuláris markerek (interdelta, MSP, mitokondriális DNS és kariotípus) 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 esetben 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 Tarcában 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 kariatípusok és a törzsek eredete között. Nem tudjuk, hogy milyenek lehettek a kariatípusok 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 kariatípusai 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 H₂S-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 H₂S-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 azzal 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 CO₂ 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°C-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. cerevisie* 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 dinamikusán kiejedtek. Ezzel teljesítik azt a fő elvárást miszerint a starterkultúrával való beoltással az erjedés elhúzódását és elakadását akarják a borászok kiküszöbölni. A *C. zemplinina* 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 ízhibásnak 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) 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. 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 kierjesztett 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.

5. Az új tudományos eredmények felsorolása

1. A Soós és Ásvány által izolált törzsek pontos taxonómiai meghatározását a D1/D2 domének és az rDNS ITS régióinak a szekvencia elemzésével elvégeztük. Eredményeink alapján mindegyik izolátum *S. cerevisiae*-nek bizonyult.
2. Az rDNS szekvenciáik nem voltak azonosak, két csoportot különböztettünk meg (I-típus és II-típus). A II. típusú törzsekre jellemző különbségek egyidejű jelenléte a közép-európai földrajzi régióra jellemző „őshonos” *S. cerevisiae* borélesztő törzseinek egy (al) populációjának specifikus molekuláris markere lehet.
3. Érdekes módon úgy tűnik, hogy a hosszú távú laboratóriumi fenntartás nem váltott ki kimutatható konvergens adaptív evolúciót a tokaji törzsek genomszerkezetében és fiziológiai tulajdonságaiban.
4. A törzsek erjesztési képességei cáfolják azt a széles körben elterjedt nézetet, miszerint a laboratóriumi körülmények közötti tartós tenyésztés veszélyezteti a törzsek fermentációs képességeit.
5. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a százéves gyűjtemény egyes tagjai jó alternatívák lehetnek a Tokaji borvidéken széles körben használt régióidegen kereskedelmi starterkultúrák kiváltására.
6. 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.
7. Az általunk létrehozott multistarter kultúránkkal beoltott tételek probléma

mentesen és dinamikusán kiejedtek 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.

6. 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 technikai 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.



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.**: Phytoantipicins: 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., Juhász 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 tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.06.05.



Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

Development of viticultural starter cultures in the Tokaj wine region

by Zoltán Kállai

Supervisor: Dr. Sipiczki Mátyás



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2024

1. Aims

1. Our aim was to collect the published datas of Tokaj strains isolated from the Tokaj wine region by researchers from the Institute of Ampelology. Accurate taxonomic identification of the strains and re-evaluation of their physiological characteristics. Accurate DNA-based taxonomic identification of isolates, because the technical knowledge of the time did not allow this at the time of isolation. We would like to discover the physiological and genetic diversity of the strains and their possible relationships. In particular, we would like to know how the artificial maintenance of the strains for more than 100 years could have affected their oenological properties, whether they could be used for wine fermentation after such a long period of time, and whether they could be used as wine starter cultures.

2 Investigation of the fermentation potential under microvinification conditions of Tokaj strains collected by researchers from the Institute of Ampelology from the Tokaj wine region. Strains held in strain culture collections are rarely used as starter cultures, as they represent only a small fraction of the true diversity of natural populations and generally perform poorly in wine fermentation. Their lower efficiency is assumed to be due to a loss of good fermentation ability as a result of prolonged breeding under non-selective conditions for better fermentation performance, but no solid experimental evidence supporting this hypothesis has been presented so far (Pizzaro et al., 2007).

3 Developing a local selected multistarter culture

A wine produced by optimally conducted spontaneous fermentation has a richer aromatic complexity than a wine inoculated and fermented by pure culture of a single yeast species. This is due to the fact that the spontaneous fermenting microbial population is rich in species. During alcoholic fermentation, different yeast species produce different metabolites, so-called fermentative aromas, which enrich the aroma composition of the wine. In order to model this phenomenon, companies producing and marketing starter cultures have recognised the potential of *non-Saccharomyces* species and are proposing the use of other wild yeasts in addition to *Saccharomyces cerevisiae* for co-inoculation or sequential inoculation to enrich the wine with different fermentative aroma components. Therefore, we selected two other yeast species, *Saccharomyces uvarum* and *Candida zemplinina*, because they are typical wine yeast species in the Tokaj wine region. We would like to examine the oenological properties of their strains to see if they could be used to create locally selected mixed starter cultures in order to further enhance the organoleptic properties of the wines. This could replace the use of commercial starter cultures from foreign wine regions by local wine producers.

2. Literature review

Wine yeasts and controlled fermentation

Countless microorganisms can be found in vineyards and on the grapes themselves. However, there are only a small number of microorganisms which, if they get into the must, are able to multiply and survive permanently in it. The low pH of must (pH 3.0-3.8) exerts strong selection pressure on microorganisms (Heard and Fleet, 1988). As soon as yeasts start their anaerobic energy-producing metabolism, ethyl alcohol is produced, which will further reduce the amount of viable microbes in wine due to its toxicity (Eperjesi et al., 1998). The yeasts that enter the winery on the surface of the grapes or settle on the processing machinery are able to initiate fermentation and carry it out under the right conditions. During this process, species form a continuously varying, diverse population depending on their nutrient requirements and their tolerance to the alcohol produced (Fleet and Heard, 1993). This process is called spontaneous fermentation. Due to the numerous yeast species involved in fermentation and their enzymes, the wine acquires a rich aroma complexity, as different yeasts produce different secondary metabolites, aroma components, during fermentation (Charoenchai et al., 1997). The inappropriate processing of the raw material or the use of unsuitable oenological techniques may slow down spontaneous fermentation, in extreme cases it may even stop completely, or cause fermentation problems that may result in the appearance of unpleasant aromas and flavours.

Members of the genus *Hanseniaspora* are dominant on the surface of the grape berry and may account for 50-75% of the total yeast population (Fugelsang and Edwards, 2007). Together with *Candida*, they dominate the initial phase of spontaneous fermentation, followed by *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*,

Meschnikowia and *Pichia* species until the alcohol concentration reached 3-4 v/v% (Fleet, 1993). In the final phase of fermentation, alcohol tolerant species are identified, with the genus *Saccharomyces* representing the predominant species (Ribéreau-Gayon et al., 2006). However, other *non-Saccharomyces* yeast species, such as *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* and *Zygosaccharomyces* species, may be present throughout the fermentation process and even in the finished wine (Martini and Martini, 1990).

Yeasts can be both beneficial and detrimental, causing spoilage, from the oenological point of view. Many environmental factors influence the composition of the yeast population during spontaneous fermentation, which is why the quality of spontaneously fermented wines will vary from vintage to vintage. These factors include grape variety, temperature, precipitation and other weather influences, soil, fertilisation, irrigation, phytotechnical and plant protection operations, physical damage caused by plant pathogenic fungi, insects and birds. In addition, yeasts are also found on harvesting equipment, crates and containers, and in contact with the grapes they begin microbial activity before the grapes have even reached the winery (Fleet 2007). Therefore, gentle harvesting and rapid, preferably refrigerated, delivery are important. In addition, the composition of the yeast community can be further modified by the hygiene conditions of the winery, must handling, cleaning, sulphurisation and possible inoculations.

Many wineries, despite the fact that spontaneous fermentation takes longer and the outcome is more uncertain, are taking the risk in the hope of obtaining wines with a unique character. It is believed that the diverse yeast populations involved in spontaneous fermentation produce more glycerol and other flavour components, which make the wine taste rounder and richer (Romano et al., 1992;

Schütz and Gafner 1993; Lema et al., 1996; Egli et al., 1998). An additional advantage may be the longer lag phase before the noisy fermentation, during which oxygen can react with anthocyanins and other phenols in the absence of ethanol, which enhances colour stability in red wines. Large-scale wineries, where consistent high and reproducible quality is a requirement, cannot afford to take such risks.

The need to produce high quality wines has required more in-depth research into wine yeasts. It has been recognised that reproducible high quality can only be achieved by carrying out alcoholic fermentation using pure cultures of yeasts with excellent oenological properties, so-called starter cultures (in the form of active dried yeasts). This practice, which was developed in the 1970s, shortens the lag phase, ensures rapid and complete fermentation of the must and contributes to a more reproducible final product (Bauer and Pretorius, 2000).

Oenological uses of *Saccharomyces*

Nowadays, biotechnology has achieved the acceleration of fermentation, the control and manipulation of fermentation processes by inoculating musts with dried yeast cultures ("starter") (Bauer and Pretorius, 2000). Wine starter cultures are single-cell cultures of different yeast strains selected from musts and wines of different wine regions for their excellent oenological properties. Inoculated into must, these cultures carry out alcoholic fermentation quickly and safely, and are therefore considered an essential tool for controlled fermentation. In addition to the primary role of yeast in efficiently converting glucose and fructose to alcohol without producing unpleasant side flavours, today's winemakers require strains

with a wide range of specific characteristics, selected according to the style of wine to be made and the technical requirements of the winery.

Requirements for good yeast starter cultures (Magyar 2010, Degre 1993, Rainieri and Pretorius, 2000, Coulon and Mtsi, 2006, Vinicius and Mtsi, 2020):

- rapid initiation of fermentation
- rapid fermentation
- high alcohol yield
- good alcohol tolerance
- high osmotic tolerance
- low temperature optimum
- good sulphuric acid tolerance
- low sulphite binding capacity
- moderate foam formation
- solid sediment formation
- high glycerol production
- low volatile acid production
- low acetaldehyde production
- minimal hydrogen sulphide production
- low urea formation
- low biogenic amine production
- low ethyl urea formation

- high genetic stability
- resistance to drying
- have proteolytic activity
- have beta-glucosidase activity
- possess modified esterase activity
- have a low nitrogen requirement
- enhanced autolysis
- Special cases:
 - o neutral fermentation aroma formation
 - o have killer activity

It should be noted that the use of *S. cerevisiae* starter cultures does not necessarily inhibit the growth and metabolic activity of wild *S. cerevisiae* strains or *non-Saccharomyces* yeasts.

It is generally accepted that the fermentation of both spontaneous and inoculated wine is influenced by the diversity of yeasts associated with the vineyard and the winery. The richness of yeast biodiversity in the different wine producing regions of the world is still largely untapped in terms of its potential for wine production. As more is known about the physiological properties of the different species, the potential of using mixtures of *S. cerevisiae* strains and *non-Saccharomyces* species as starter cultures has been recognised (Jolly et al., 2014). Thus modelling and combining the advantageous property of spontaneous fermentation (Egli and Mtsi 1998; Garcia-Rios et al., 2014). At the same time, the need arose to select and breed strains that are uniquely suited to a given wine region, even vineyard and winery, into starter cultures.

Characteristics of *Candida zemplinina* (*Starmerella bacillaris*)

In the course of studying the microbiota of Tokaj wines, Sipiczki (2003, 2004) isolated several strains during the fermentation of botrytised musts, which he identified as *C. stellata* using classical taxonomic methods. Further investigation of these strains revealed that some strains have superior osmotic tolerance and cold tolerance compared to the type strain *C. stellata* (CBS 157). Furthermore, the strains were able to grow at high glucose concentrations that already inhibited *C. stellata*. The Tokaj isolates also differed in morphology from *C. stellata*. Based on the results, *C. zemplinina* was described as a new osmo- and psychotolerant, fructophilic and acidogenic yeast species with high similarity to *Candida stellata*. On further investigation, *C. zemplinina* was found to be able to grow at high glucose concentrations that already inhibited both *C. stellata* and *S. cerevisiae*. *C. zemplinina* can grow faster than *C. stellata*, *S. cerevisiae* and *S. uvarum* at low temperatures. The *C. zemplinina* isolates can also multiply in the presence of ethanol, although their alcohol tolerance is not as good as that of *S. cerevisiae* and *S. uvarum*, so they are not considered to be real competitors in fermentation. Because of the above-mentioned properties, it has recently been increasingly considered as a potentially useful yeast for inoculation with *Saccharomyces* yeasts to improve the complexity and highlight the specific characteristics of wines (Tofalo et al., 2009, 2012).

3. Methods

Molecular taxonomy of strains

Amplification of rRNA coding regions by polymerase chain reaction and sequence analysis

Sequence analysis of two conserved regions, ITS1-5.8S rRNA-ITS4 and the regions encoding the D1/D2 domains of the 26S rRNA large subunit (LSU), was used for accurate molecular taxonomic determination (White et al., 1990) (O'Donnell, 1993). The PCR products were sent to the Microsynth laboratory in Vienna for sequencing. To investigate the taxonomic affiliation of the sequences, a general similarity search was first performed in the NCBI GenBank database using the associated BLAST service. Based on the most similar matches, the species to which the sequence belonged was likely to be identified. To clarify this, the sequence was compared with the sequence of the type strain of the species downloaded from the CBS database (<http://www.cbs.knaw.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=CBS%20strain%20database>).

PCR fingerprinting methods

The following RAPD and microsatellite primers were used:

Primer 24 (Baleiras Couto Mtsi., 1996), primer RF2 (Paffetti and Mtsi., 1995), and (GTG)₅ ((Lieckfeldt and Mtsi., 1993), 1283 ([Akopyanz et al., 1992](#)). Inter-delta genotyping (δ -PCR) was performed according to the protocol of Legras and Karst (2003). δ -PCR reactions were performed in two combinations: delta1-2 and delta 12-2, according to Pfliegler and Mtsi 2014.

A binary matrix was generated from the band samples, from which a distance matrix was calculated based on the Dice coefficient, and a dendrogram was constructed using the UPGMA algorithm using the <http://genomes.urv.es/UPGMA/> service (Garcia-Vallvé and Mtsi., 1999). The results of the two interdelta and three RAPD/microsatellite analyses were combined to obtain two more detailed dendrograms.

Electrophoretic karyotyping

Karyotyping was performed according to the protocol of Karanyicz et al. 2017.

We examined the number and size of bands representing chromosomes. The karyotypes of the strains were compared by UPGMA analysis.

Mitochondrial DNA (mtDNA) extraction and restriction analysis.

mtDNA was extracted from exponential phase cultures according to the protocol of Defontaine et al. (1991).

The resulting fragments were separated in 0.5x TBE in 0.7% w/v agarose gel and visualized in a transilluminator.

Physiological examination of strains

Macro- and micromorphological studies

During macromorphological studies, were observed the shape, size, colour, texture, surface, structure and outline of the yeast colonies.

In the micromorphological study, the size, shape, asexual properties of yeast cells were observed by phase-contrast microscopy at 400X magnification.

Growth and assimilation studies

Conventional yeast species identification methods were carried out according to the descriptions of Kreger van-Rij and Barnett (Kreger van-Rij 1984, Barnett et al., 1990). Assimilation studies allow us to determine the carbon and nitrogen sources that the isolated yeast strains can use in their metabolic processes.

Determination of sporulation capacity

Sporulation was induced on sporulating K-acetate medium. A loop of colonies grown on YPGA complete medium was grafted onto the sporulation medium. The Petri dishes were incubated in a 25 °C thermostat for 30 days and observed for their sporulation ability under a phase-contrast microscope at 400X magnification.

Hydrogen sulphide production capacity of strains

Hydrogen sulfide production capacity was determined by two different methods. Hydrogen sulfide production was determined on Nickerson (BiGGY) agar (DIFCO) based on the article by Nickerson WJ. 1953. The hydrogen sulfide production capacity of the strains was also determined using the method of Linderholm (Linderholm and Mtsi, 2008) under fermentation conditions.

The acid-producing capacity of strains

The acid-producing ability of the strains was tested on Custer's chalk agar (Belarbi and Lemaresquier, 1994). The dissolution zone formed in the case of acid production was examined.

Killer activity test

Killer activity was tested according to Woods and Bevan (1968).

Osmotic tolerance test

The effect of osmotic conditions on the growth of strains was investigated in YPGA medium containing 2, 20, 30, 40, 50 and 60% w/v glucose and in YPGL medium.

Investigation of the competitiveness of *C. zemplinina* in mixed starter cultures

For the study, modified YPL media were prepared with 20% w/v and 40% w/v glucose content, 8 v/v% ethanol final concentration and different inoculation rates. Species were separated by cell size. To distinguish between *S. cerevisiae* and *S. uvarum* strains, spread samples onto complete YPGA culture plates and then randomly isolated 100-100 colonies. Isolates were placed in a 37 °C thermostat for 3 days. *S. cerevisiae* was able to grow at this temperature, while *S. uvarum* is not, so we determined the rate at which the strains outgrew each other.

Microvinification

Microvinification to study Tokaj strains isolated by Soós and Ásvány:

For the analysis of all Tokaj strains, 50 ml of autoclaved yellowmuscat must (204.3 g/l sugar content, 6.38 g/l acidity, pH: 3.38) was inoculated with 5×10^6 cells/ml and incubated in a 12 °C thermostat for 30 days. Fermentation was investigated in two parallel experiments. Sugar, glucose, fructose and alcohol contents were determined every 5th day. On day 30, fermentation was completed and the residual sugar, glycerol, final alcohol, total acid and volatile acidity of the wines were determined using a Bruker Alpha FTIR spectrometer (Bruker Optic GmbH, Germany).

For further analysis of strains 10-1347 (T7) and 10-1358 (T22), 1 litre of autoclaved yellowmuscat must (259.5 g/l sugar; 5.0 g/l acid; pH 3.69) was inoculated to a cell count of 5.0×10^6 cells/ml per final volume and placed in a 12 °C thermostat. Fermentation was investigated in two parallel experiments. The fermentation dynamics were detected by measuring the sugar content of the must. The basic analytical analysis of the wines obtained was carried out using the

clastic methods, determining the alcohol, sugar, acidity, volatile acidity and pH of the wines.

Microvinification for testing strains selected for multistarter development

To study the physiological properties of *C. zemplinia*, *S. cerevisiae* and *S. uvarum* strains, the strains were inoculated into Erlenmeyer flasks in YPGL 50 ml of medium with 20% w/v glucose, 0.1 OD and subjected to 20 days of test fermentation at two temperatures (12 °C and 25 °C).

Since the fermentative aromas produced by yeasts are very important for wine quality from the oenological point of view, we performed a trial fermentation in yellowmuscat must with selected strains of *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and *C. zemplinina*. The fermented wines were evaluated by organoleptic analysis using a 20-point system.

Semi-commercial fermentation experiments for the development of multistarter:

The fermentation experiments were carried out in 2010 and 2011 at the Tokaj Kereskedőház Zrt. winery and in 2012 at the Tokaj Research Institute of Viticulture and Enology. The wines fermented in 2012 were evaluated using a 100-point scoring system. In 2013, the fermentation experiment in wooden barrels was set up at the Majoros winery.

Inoculation with starter culture

Inoculation with yeast culture in liquid starter culture medium (YPGL) was performed for both the lab-scale and the semi-factory fermentation. The

strains were propagated at 25 °C. The inoculation was performed at a cell concentration adjusted to a final volume of 5.0×10^6 cells/ml. Cell counting was performed using a Bürker chamber. The volume of cell suspensions used for inoculation was equal to the volume of must to be inoculated. The volume units for pure cultures (10-374, 10-486 and 10-489) were 3/3, whereas for mixed multistarter the volume units were $1/3$ 10-486 + $1/3$ 10-489 + $1/3$ 10-374.

Classical wine analysis

The determination of sugar, alcohol, acidity and volatile acidity was carried out by classical analytical methods according to the International Organisation of Vine and Wine (OIV) International Methods for the Analysis of Wine and Must (Master OIV, 2023).

Instrumental analytical methods

The alcohol production capacity of *C. zemplinina* strains was determined by measuring the concentration of ethanol detectable in the fermentation broth using the TDI Alcoquick 4000 infrared analyzer. The production of acetic and malic acids was determined by analytical measurement of the YPGL broth of the strains inoculated with overnight culture using a TDI MiuraOne automatic wine analyser.

The total sugar content, total acidity, glucose, fructose, glycerol, glycerol, acetic acid and alcohol concentrations of the strains isolated by Soós and Ásvány were determined using a Bruker Alpha FTIR spectrometer (Bruker Optic GmbH, Germany).

HS-GC-MS analysis of volatile compounds (coupled technique of vapour phase and sample preparation, gas chromatograph and mass spectrometer)

The determination of volatile aroma compounds in wines was performed with a Bruker Scion 436 gas chromatograph coupled to a Bruker SQ mass spectrometer. Mass spectra were recorded in full scan mode. The identification of volatile compounds was based on mass spectrometric data obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST) Mass Spectrometry Library (2005 version).

Organoleptic evaluation

The most accepted and recognised quality assessment of wines is traditionally carried out by committees of wine experts. The 100-point method of the International Organisation of Vine and Wine (OIV) is the most widely used sensory method for rating wines (OIV332a). The OIV method uses five predefined sensory categories that can be applied to all types of wine and thus distinguish between high and low quality. A simplified version of the method is the 20-point scoring system. The 20-point scoringsystem assesses the wine's colour (2 points for white wine, 4 points for red wine), clarity (max. 2 points), aroma (max. 4 points), taste, flavour and overall impression (12 points for white wine, 10 points for red wine).

4. Results and discussion

To determine the taxonomic affiliation of the old Tokaj isolates, molecular studies and physiological tests applied in modern yeast taxonomy were performed. Sequence analysis of the D1/D2 domains and ITS regions of rDNA and physiological studies revealed all isolates *to be S. cerevisiae*. *S. uvarum* was not found among them, although *S. uvarum* is quite common in the Tokaj Wine Region (Minarik and Laho, 1962; Sipiczki and Mtsi., 2001; Antunovics and Mtsi., 2005; Magyar and Bene, 2006).

Although the rDNA analysis clearly assigned all strains *to S. cerevisiae*, their rDNA sequences were not identical and they were divided into two groups (type I and type II). Type II strains differed from neotype *S. cerevisiae* strains in two positions of the D1/D2 domain and in five positions of the two ITS segments. The same differences were found in the database sequences of several wine yeast strains isolated in Slovakia and Austria compared to the neotype strain. The simultaneous presence of all these differences may be a specific molecular marker for a (sub)population of 'indigenous' *S. cerevisiae* wine yeast strains in the Central European geographical region.

These strains appear to be components of the autochthonous yeast biota that have persisted for a long time, from the years of isolation of the Tokaj strains (1901-1906) and the isolation of the two Slovak strains (1954) until the present day (2017) when the two ice wine yeast clones were isolated in Slovakia. The sporadic occurrence of the pattern in some Spanish, one French and one Australian wine regions and on different substrates can be attributed to the spread from Central European vineyards. The similarity of the ITS sequence of type II strains with the ITS sequence of yeasts isolated in the Jura (Charpentier et al., 2009)

suggests a close relationship between the strains of the two groups. Further experiments are needed to verify this possibility, as D1/D2 sequences are not available for Jura strains.

Comparative analysis of less conserved molecular markers (interdelta, MSP, mitochondrial DNA and karyotype) revealed much greater variation between strains.

When all markers are taken into consideration, the majority of strains have a unique pattern, suggesting that most strains have a unique genome structure. The exceptions to this are the pair of strains with Type I sequence 10-1354 (T15)/10-1355 (T18) and the pair of strains with Type II sequence 10-1347 (T7)/10-1349 (T9) whose members were indistinguishable in all tests. Interestingly, none of the pairs were isolated from the same location and the same vintage. Apart from these identities, both Type I and Type II strain groups were diverse, but remarkably formed well distinct clusters, as if biologically isolated. The different origins of the molecularly indistinguishable strains indicate that in the early 1900s, *S. cerevisiae* strains must have existed in the Tokaj region that were persistently present in several wineries. The identity of the molecular patterns of the strain pairs 10-1354 (T15)/10-1355 (T18) and 10-1347 (T7)/10-1349 (T9) suggests that their genomes have not changed during decades of laboratory strain maintenance. In contrast, some strains isolated in the same place and year (e.g. 5 strains isolated in Tarcal in 1901) had different molecular patterns. These strains may have been different from each other at the time of isolation, but it is also possible that they originated from the same clone and only diverged later during propagation under laboratory conditions.

When comparing molecular samples, it is important to note that fingerprinting methods require exactly the same conditions for all strains in all reactions to

ensure a high level of reproducibility (e.g. Pfliegler et al., 2014), and minor changes in banding patterns are often difficult to evaluate. Furthermore, the increased diversity observed in the inter-delta analysis may not accurately reflect the diversity at the time of strain isolation, as specific stress effects on strains by different preservation methods may have mobilized certain Ty1 retrotransposons (to which delta sequences are partially linked). For example, in a previous study (Stamenova and Mtsi., 2008), freezing and thawing increased the frequency of Ty1 transposons.

We were somewhat surprised to find no correlation between karyotypes and strain origin. We don't know what the karyotypes might have been at the time of strain isolation, but it is clear that prolonged laboratory strain maintenance did not make them identical. It is worth mentioning here that in a previous study we found no correlation between chromosomal patterns and where and from which wine *Saccharomyces* strains were isolated geographically (Csoma et al, 2010). In another study, no correlation was found between the ability to form membranes and the karyotypes of the strains, while a clear correlation was observed between membranes formation and certain inter-delta and microsatellite patterns (Charpentier and Mtsi., 2009; Legras and Mtsi., 2014).

High molecular diversity was associated with relatively high variability in certain phenotypic properties and characteristics, such as teleomorphology, cell morphology, sporulation efficiency and H₂S production.

Diversity was lower in the phenotype of killer activity and in relation to flocculation. When all traits are taken together, virtually every strain has a unique phenotype. This is in line with the results of molecular (genetic) studies, which identified almost all strains as unique. The high degree of phenotypic diversity is not surprising, since phenotype is essentially determined by genotype. For

example, recent findings (Granek and Magwene, 2010) have shown that the morphology of *S. cerevisiae* colonies is determined by complex networks of genetic determinants that are involved in other cellular processes, such as the integration of nutrient signals and responses to changes in the environment.

Sporulation is another trait that is regulated by complex genetic interactions. The main determinant of sporulation is the heterozygosity of the mating type (cells of homothallic strains are usually heterozygous) but the efficiency of the process depends on the function of several downstream genes (Herskowitz, 1988). Inactivation or reduced activity of any of these genes can prevent sporulation, or at least reduce its efficiency. Another cause of poor sporulation may be chromosome heterogeneity, which impairs the accuracy of chromosome pairing during meiosis prophase. Inappropriate chromosome pairing occurs primarily in interspecific hybrids that have two (partially) different sets of chromosomes (Karanyicz et al., 2017). Since none of the Tokaj strains had a supernumerary band in their karyotype, it is unlikely that any of them would have an interspecific hybrid or alloaneuploid genome. Several studies have shown that adaptation of yeast cultures to changing conditions is usually accompanied by genomic changes (adaptive evolution), and that variants with similarly altered genomes (including similar changes in karyotypes) tend to become dominant in different cultures exposed to the same stress conditions for longer periods (convergent adaptive evolution) (e.g. Gresham and Mtsi., 2008; Mangado and Mtsi., 2018; Piotrowski and Mtsi., 2012). Interestingly, long-term laboratory maintenance does not appear to have induced detectable convergent adaptive evolution in the genomic structure and physiological traits of Tokaji strains.

The diversity of individual traits showed significant variation with respect to oenologically important phenotypic characteristics. The strains differed greatly in

H₂S production (both on solid medium and under fermentation conditions) and initial fermentation vigour. Most of them differed moderately in glycerol production and only slightly in fermentation performance, ethanol production and acid production at the end of fermentation. Interestingly, most of them performed better than the commercial starter culture strain and were much better than the laboratory strain (S288C) during fermentation of must from grapes. We still do not know what the fermentability of these strains was at the time of their isolation, but their good performance in our laboratory fermentation experiments demonstrates that prolonged maintenance in a non-fermentative environment did not have a detrimental effect on their fermentability. This finding casts doubt on the widely held view that prolonged culture under laboratory conditions compromises the fermentative capacity of the strains (Pizarro Mtsi., 2007).

Soós and Ásvány (1950) do not discuss the conditions of strain maintenance in their publication, but István Soós in his book *Borbakterologia* (1948) described a method for long-term laboratory maintenance. In this, a 10% sucrose solution was used in a cork-sealed 'Fredenreich flask'. This flask was stored in a dark place at low temperature. The strains were refreshed every five years. This method was used to maintain the strains until the 1980s. The strains were then lyophilised. The strain vial we used was dated 1985.

Our results suggest that some members of the centenary collection could be good alternatives to the commercial starter cultures widely used in the Tokaj wine region. However, further studies are needed to select the most suitable strains for such purposes.

Nevertheless, the use of monoculture starter cultures is becoming less important in wine technology. A further aim of our work was to develop a starter

culture consisting of a mixture of several yeast species selected from Tokaj.

Based on our previous results, we know that the wine region is characterised by the presence of cryotolerant *S. uvarum* strains and we have been able to isolate and describe the osmotolerant and fructophilic species *C. zemplinina* from the wine region. On the basis of these results, it was considered that the two other species mentioned above could be a suitable pairing for the yeast species *S. cerevisiae*. In our strain collection we had several strains of local isolation whose oenological potential was unknown to us until now.

At the time of our experiments, there was no extensive literature on the oenological properties of *C. zemplinina*, so we started our study with a larger number of strains and included strains isolated from other geographical locations and not only from oenological environments in our initial experiments.

The most serious selection pressure on yeasts during the fermentation of Tokaj sweet wines is the extremely high sugar content of musts, which acts as a significant osmotic stress to limit the number of yeasts that can complete fermentation. Therefore, we evaluate the osmotic tolerance of strains as an important aspect of our selection.

Test fermentations were performed to investigate the ethanol production capacity of *C. zemplinina* strains. Only one strain produced relatively low amounts of ethanol from 20% w/v glucose in the culture medium after 20 days of fermentation at 25°C (11-10 strains with 8.52, v/v%), while the majority of strains were able to produce ethanol above 9 (v/v%). In the test fermentations at 12°C, the differences in ethanol production were much greater (from only 3.7 to almost 10.3 (v/v%))

The strains showed relatively little variation in their acid production profiles. Significant malic acid production (greater than 0.3 g/l) was not observed in any strain, while acetic acid production ranged from 1.3 to 2.9 g/l depending on the strain and fermentation temperature. The amount of acetic acid produced was higher at fermentation temperatures of 12°C than at 25°C for all *C. zemplinina* strains.

The fermentation performance of the strains was inferred from the mass loss due to CO₂ volatilization. Most of the strains showed relatively fast and vigorous fermentation at 25°C. The fermentation strength decreased moderately at 12°C.

The results suggest that *C. zemplinina* strains alone are not capable of fermenting wines, but may be suitable as components of mixed starter cultures for fermentation.

We included five *S. uvarum* and ten *S. cerevisiae* strains isolated from the Tokaj wine region in our studies. Their physiological results were less variable compared to *C. zemplinina* strains. The strains showed mostly different fermentation dynamics at 12 °C. The ability of *S. cerevisiae* strains to produce hydrogen sulphide at 12° was found to be more favourable compared to *S. uvarum* strains.

The selection of the final strains was weighted according to their aroma-producing ability. *C. zemplinina*, *S. cerevisiae* and *S. uvarum* strains isolated from the Tokaj wine region were also subjected to trial fermentation in yellow must to evaluate the strains from a sensory point of view. Among the *C. zemplinina* strains, 10-374 and II SE 12 scored 14.75±1.71 and 14.75±1.91, respectively, in a tie for the sensory evaluation. Strain 10-374 was selected because of its

osmotolerance, being able to grow at 60% w/v glucose, while strain II SE 12 was selected only at 40% w/v. Among the *S. cerevisiae*, 10-489 scored the highest in the sensory evaluation (15.00 ± 1.26), while 10-486 performed the best among the *S. uvarum* (15.25 ± 2.06). The selected strains have no killer activity and are not sensitive to K1 and K2 toxin. This trait raised questions about their competitiveness with wild *Saccharomyces* already present in must, but semi-factory fermentation experiments have shown that they are not at a disadvantage and are not crowded out by wild strains.

An even more exciting question for *C. zemplinina* was how it could compete in mixed culture with the two *Saccharomyces* species with good fermentability during fermentation. In order to answer this question, the interaction of the species was monitored in media mixed in different proportions and with different selection parameters (20% w/v, 40% w/v glucose, +8%v/v ethanol). We were able to isolate strains of *C. zemplinina* (10-374) at detectable concentrations in the most harsh medium and in the most unfavourable 1:4 (*C. zemplinina*: *Saccharomyces spp.*) inoculum, even after 245 h. Based on the inoculations, *S. uvarum* (10-486) competes more vigorously with *C. zemplinina* than our strain *S. cerevisiae* (10-489).

In this paper, we discuss the experience of semi-factory experimental fermentations of four vintages. In the first year, our main task was to verify the competitiveness of the inoculated strains and thus their real impact on fermentation. We sampled our batches throughout the fermentation and tried to re-isolate the strains we inoculated. The assimilation profiles of the isolates were compared with the assimilation results of the inoculated strains. Based on these results, we were able to identify "starter culture suspect" strains of *S. cerevisiae*

and *S. uvarum*. From the selected strains, individuals were randomly selected for karyotyping and RAPD 1283 analysis. The karyotype pattern and the RAPD 1283 pattern did not always overlap. In general, RAPD 1283 resulted in a more diverse pattern. However, in all cases, the methods combined proved suitable for distinguishing between self-inoculated strains and wild *S. cerevisiae* and wild *S. uvarum* strains. The results of the genetic markers showed that our inoculated *Saccharomyces* strains dominated throughout the fermentations.

In all vintages, the batches inoculated with our strains fermented without problems and dynamically. This fulfils the main expectation that by inoculating with starter cultures, winemakers want to eliminate the delay and stalling of fermentation. Based on the results of physiological tests with our *C. zemplinina* strains, we found that they are not able to ferment wines on their own, but may be suitable as a component of mixed starter cultures. This is supported by our experience in semi-farm fermentation experiments. Although in all cases the fermentation rate of the wines was faster compared to the spontaneous fermentation batches used as controls, it was in all cases below the fermentation dynamics of the batches inoculated with *Saccharomyces* and mixed multistarter cultures. When self-inoculated, the sensory evaluation of the wines fermented by the inoculants was divergent. In 2010, there were reviewers who described his wine as lacking in flavour, while in 2012 he scored in the 100-point rating system with the widest spread from a minimum score of 66 to a relatively high 86. Its presence in the blend is also justified by its fructophilic character. Fermentation stalling is sometimes caused by a strong shift in the ratio of glucose to fructose in the must. In our fermentation experiments, we also found that, although only 2/3 of our multistarter cultures contain species with good fermentability, their

fermentation vigour was nearly the same or more dynamic in all vintages compared to pure *Saccharomyces* fermentations with 3/3 good fermentability.

It is interesting to note that the pure cultures scored higher on average in the 2012 judging, but with a more significant spread in each case. The batch fermented with *S. cerevisiae* (10-489) scored 79.29 ± 6.26 , the batch fermented with *S. uvarum* (10-486) scored 80.00 ± 9.49 , while the batch fermented with *C. zemplina* (10-374) scored 77.71 ± 7.76 . The high standard deviation values suggest that the wines in question divided the judges more than the lot fermented with the multistarter. Some of the judges wrote a textual comment on the evaluating sheet, where they described the multistarter fermented batch as complex, rich aromas, full-bodied. This is in line with the experience of the 2010 evaluating, where, although no scoring was done, a completely different panel of judges also gave the complex, fruity flavour, aroma intense indicators.

In 2013, in a larger batch, we compared only our multistarter combination with a commercial starter culture, Mycoferm CRU31. No major differences in basic analytical parameters were observed, but in gas chromatography analysis we were able to separate 29 aroma components from the wine inoculated with the commercial starter culture (CRU 31) and 31 from the batch inoculated with the multistarter culture. Seven aroma components were found that were either present only in the wine fermented with our own starter culture or were present in the wine fermented with the commercial starter culture but in higher concentrations in the wine fermented with the multistarter culture. The instrumental analytical study also supported our objective of developing our mixed starter culture to simulate the richer aroma complexity due to spontaneous fermentation together with the safe fermentation of the starter culture inoculation.

5. List of new scientific findings

1. The exact taxonomy of the strains isolated by Soós and Ásvány was determined by sequence analysis of the D1/D2 domains and ITS regions of rDNA. Based on our results, all isolates were identified as *S. cerevisiae*.
2. Their rDNA sequences were not identical, two groups were distinguished (type I and type II). The coexistence of differences in type II strains may be a specific molecular marker for a (sub)population of "indigenous" *S. cerevisiae* wine yeast strains typical of the Central European geographical region.
3. Interestingly, long-term laboratory maintenance does not seem to have induced a detectable convergent adaptive evolution in the genome structure and physiological properties of the Tokaj strains.
4. The fermentability of the strains refutes the widely held view that long-term culture under laboratory conditions compromises the fermentability of the strains.
5. Our results suggest that some members of the centenary collection could be good alternatives to the commercial starter cultures widely used in the Tokaj wine region.
6. Based on the results, we conclude that *C. zemplinina* strains alone are not able to ferment wines, but may be suitable as components of mixed starter cultures for fermentation.
7. The batches inoculated with our multistarter culture fermented problem-free and dynamically in all vintages. The sensory evaluation and the results of our classical and instrumental analytical tests showed that the starter culture we created was able to ferment high quality wines safely and reproducibly.

6. Acknowledgement

I would like to express my gratitude to Dr. Mátyás Sipiczki, my supervisor, for providing me with the opportunity, space and time to complete my thesis, and for his valuable advice and guidance. I would also like to express my gratitude to Dr. Ida Gálné Miklós, Head of the Department of Genetics and Applied Microbiology, and all her colleagues, as well as the staff of the Tokaj Research Institute of Viticulture and Enology, for their assistance. I would like to express my gratitude to the management of Tokaj Kereskedőház Zrt. for kindly allowing us to conduct our experiments. I would also like to express my gratitude to Dr. Zsuzsa Antunovics for her invaluable assistance with karyotyping, Dr. Walter Pfliegler for his guidance on fingerprinting methods, Anita Kovács for her technical support, and Dr. Gyula Oros for his statistical expertise. I am also indebted to Dr. Gábor Péter, Head of the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, for providing us with the Tokaj strains. Finally, I would like to thank my family for their unwavering support.

7. Irodalom – References

- 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.
- 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.
- Baleiras Couto, M. M., Eijmsa, 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.
- 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.
- Belarbi, M. A., & Lemaesquier, M. H. (1994). La caratterizzazione dei lieviti. *Vignevini*, 21, 57-59.
- 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.
- Charpentier, C., Colin, A., Alais, A., & Legras, J. L. (2009). French Jura flor yeasts: genotype and technological diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95, 263-273.
- 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.

- 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*, 421-447.
- Egli, C. M., Edinger, W. D., Mitrakul, 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.
- Fleet, G. H. (1993). Yeast-growth during fermentation. *Wine microbiology and biotechnology*, 27-54. CRC press.
- 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.
- 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.
- Granek, J. A., & Magwene, P. M. (2010). Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genetics*, 6, e1000823.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Minarik, E., & Laho, L. (1962). Die Hefen des Tokayer Weinbaugebietes. *Mitt. Klosterneuburg*, 12, 7-10.
- 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.
- 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 Vitivinicultural Origin Competitions. 2009.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pizarro, F., Vargas, F. A., & Agosin, E. (2007). A systems biology perspective of wine fermentations. *Yeast*, 24, 977-991.
- Rainieri, S., & Pretorius, I. S. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of microbiology*, 50, 15-32.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.

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., & Soccol, 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.

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



Registry number: DEENK/339/2024.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Zoltán Kállai

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10048427

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (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





List of other publications

Hungarian books (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

Foreign language international book chapters (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

Foreign language scientific articles in international journals (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, agrobiocemical 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)





List of other publications

Hungarian books (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

Foreign language international book chapters (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

Foreign language scientific articles in international journals (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, agrobiocemical 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)





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

Total IF of journals (all publications): 50,851

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 6,567

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

05 June, 2024

