

**Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék**

**HÁRTYAKÉPZŐ BORÉLESZTŐK FIZIOLÓGIAI, BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI JELLEMZÉSE**

Kovács Mónika

Doktori értekezés

Budapest
2008

A doktori iskola

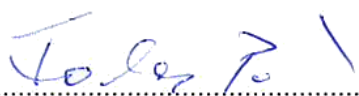
megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter, DSc
Egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: Dr. Maráz Anna, CSc
Egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.



Az iskolavezető jóváhagyása



A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2008. október 7-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Halász Anna, DSc

Kállay Miklós, DSc

Nyeste László, DSc

Hoschke Ágoston, CSc

Opponensek

Kucsera Judit, PhD

Magyar Ildikó, PhD

Titkár

Nguyen Duc Quang, PhD

*„A bölcsességet nem úgy kapjuk, magunknak kell azt felfedezni,
Oly út után, amelyet senki se tehet meg helyettünk,
Senki se tud tőle megkímélni...”*

(Proust)

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	i
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	iv
1. BEVEZETÉS	1
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Hártaképző élesztők segítségével készített borok	3
2.2. A <i>Saccharomyces</i> nemzetség	5
2.3. Hártaképző borélesztők fiziológiai változatai és faji diverzitása	7
2.4. Az élesztőgombák killer rendszere	8
2.5. A hártaképző borélesztők spórázási képessége	9
2.6. A környezeti tényezők hatása a hártaképzésre	10
2.7. A <i>Botrytis cinerea</i> és anyagcsere termékeinek hatása az aszúsodó szőlőbogyóra, a mustra és a borra	13
2.8. Hártaképző élesztők anyagcsere tevékenységének hatása a borra	14
2.8.1. Makromolekulák felszabadulása az érlelés során	14
2.8.2. A borok kémiai összetételének alakulása az érés során	16
2.8.3. A sherry borok színének fejlődése	18
2.9. A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sejtfalának jellegzetességei	19
2.9.1. A sejtfal szerepe és összetétele	19
2.9.2. Sejtfalfehérjék	20
2.9.2.1. Nem kovalensen kapcsolódó sejtfal fehérjék	21
2.9.2.2. Glükánázzal kivonható kovalensen kapcsolódó sejtfal fehérjék	21
2.9.2.3. NaOH-dal kivonható kovalensen kapcsolódó sejtfal fehérjék	22
2.9.3. Stressztényezők hatása a sejtfal szerkezetére	23
2.9.4. Sejtfalfehérjék szerepe az adhézióban, az invazív növekedésben és a biofilm képzésben	24
2.10. Az élesztősejtek hidrofób tulajdonságai	26
2.10.1. Élesztősejtekben előforduló lipidszemcsék	27
2.10.2. Oxidált zsírsavak (oxilipinek) a sejtfelszínen	29
2.10.3. A sejtfelszíni hidrofóbicitás és mérésének lehetőségei	31
2.11. Borélesztők identifikálása és tipizálása molekuláris módszerekkel	33
2.11.1. Kariotipizálás	33
2.11.2. A riboszómális-DNS szekvencia analízisen alapuló módszerek	34

2.11.3.	Mitokondriális-DNS analízis	35
2.11.4.	Molekuláris tipizálás	36
2.11.5.	DNS homológia vizsgálatok	37
3.	CÉLKITŰZÉSEK	39
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	40
4.1.	Alkalmazott törzsek	40
4.2.	Táptalajok, táplevesek.....	41
4.3.	Oldatok.....	43
4.3.1.	DNS munkákhoz alkalmazott oldatok	43
4.3.2.	Sejtfalfehérje vizsgálatához alkalmazott oldatok	45
4.4.	Gélelektroforézishez alkalmazott gélek	46
4.5.	Módszerek.....	47
4.5.1.	Hártyaképző borélesztő törzsek izolálása	47
4.5.2.	Killer tulajdonság vizsgálata.....	48
4.5.3.	Meiospórák izolálása.....	48
4.5.4.	Genomi DNS izolálása.....	48
4.5.5.	rDNS RFLP analízise.....	49
4.5.6.	Heteroduplex analízis.....	49
4.5.7.	RAPD analízis.....	50
4.5.8.	Erjesztési próba	51
4.5.9.	A hártaképző borélesztők szaporodását befolyásoló környezeti tényezők vizsgálata.....	52
4.5.10.	A hártaképző borélesztők hártaképzését befolyásoló környezeti tényezők vizsgálata.....	52
4.5.11.	A sejthozam meghatározása.....	53
4.5.12.	A sejtfelületi hidrofóbicitás meghatározása	53
4.5.13.	Az invazív növekedés és az adhézió vizsgálata	55
4.5.14.	Sejtfalfehérjék biotines jelölése és izolálása	55
4.5.15.	Sejtfalfehérjék elválasztása és Western-blot analízise.....	56
4.5.16.	A <i>HSP150</i> gén RFLP analízise	57
5.	EREDMÉNYEK	58
5.1.	Hártaképző borélesztő törzsek izolálása tokaji szamorodni felületéről	58
5.2.	A hártaképző borélesztő törzsek jellemzése killer tulajdonság és morfológiai szempontból	59
5.2.1.	A hártaképző élesztők killer tulajdonságának vizsgálata.....	59

5.2.2.	A hártaképző élesztők spóráképzése.....	59
5.2.3.	A hártaképző élesztők mikroszkópos és makroszkópos jellemzése	59
5.3.	Az rDNS RFLP analízise	61
5.4.	Az rDNS homológia vizsgálata heteroduplex analízissel	64
5.5.	A hártaképző borélesztők RAPD analízise	67
5.6.	A hártaképző borélesztők cukorerjesztési spektrumának meghatározása.....	69
5.7.	A hártaképző borélesztők szaporodását és hártaképzését befolyásoló környezeti tényezők jellemzése	69
5.7.1.	Glükóz koncentráció hatása a szaporodásra és a hártaképzésre	70
5.7.2.	Etanol koncentráció hatása a szaporodásra és a hártaképzésre.....	72
5.7.3.	pH hatása a szaporodásra és a hártaképzésre	74
5.8.	Sejtfelületi hidrofóbicitás vizsgálata	77
5.8.1.	A pH hatása a hidrofóbicitásra.....	77
5.8.2.	A hidrofóbicitás változása a szaporodás során	78
5.8.3.	Enzimek hatása a hidrofóbicitásra	80
5.8.4.	Borélesztők Lewis sav-bázis kölcsönhatásának meghatározása.....	81
5.9.	Az adhézios képesség és az invazív növekedés vizsgálata	82
5.10.	A hidrofóbicitás és a hártaképzés alakulása aszpirin jelenlétében.....	84
5.11.	Hártaképző élesztőgombák sejtfalfelhérjéinek analízise	84
5.12.	A <i>CCW7/HSP150</i> gén vizsgálata.....	85
5.12.1.	A <i>HSP150</i> gén RFLP analízise	87
5.12.2.	A <i>HSP150</i> gén polimorfizmusának meghatározása szekvenálással	88
5.12.3.	A <i>HSP150</i> allélok szegregációja.....	92
6.	KÖVETKEZTETÉSEK	94
6.1.	A hártaképző élesztőgombák fiziológiai jellemzése.....	94
6.2.	A hártaképző élesztőgombák taxonómiai helyzete és molekuláris jellemzése.....	96
6.3.	Hártaképző élesztőgombák sejtfalszerkezetének jellemzése	97
6.4.	Az elért kutatási eredmények gyakorlati vonatkozásai.....	98
7.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	99
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	100
9.	SUMMARY	102
	IRODALOMJEGYZÉK.....	104

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- ALD: Alcohol dehydrogenase (alkohol dehidrogenáz)
- ASL: Alkali-Sensitive Linkage (lúg-érzékeny kötés)
- Ccw: Covalently bound cell wall protein (kovalensen kötődő sejtfa fehérje)
- CSH: Cell Surface Hydrophobicity (sejtfelszíni hidrofóbicitás [SFH])
- CLP: Chromosome Length Polymorphism (kromoszóma hossz polimorfizmus)
- GPI: Glycosylphosphatidylinositol
- HA: Heteroduplex Analysis (heteroduplex analízis)
- HSP: Heat Shock Protein (hő sokk fehérje)
- IGS: Intergenic Space (gének közötti elválasztó régió)
- ITS: Internal Transcribed Space (köztes átíró régió)
- MATH: Microbial Adhesion To Hydrocarbons (Mikrobák szénhidrogénekhez való adhézija)
- MATS: Microbial Adhesion To Solvents (Mikrobák oldószerekhez való adhézija)
- mtDNA: mitokondriális DNS
- OD: Optical Density (optikai denzitás)
- ORF: Open ReadinFrame (nyitott leolvasási keret)
- PCR: Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)
- Pir: Protein with Internal Repeat (belső ismétlődéseket tartalmazó fehérje)
- RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA (véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS)
- rDNA: riboszómális DNS
- RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (restrikciós töredék hossz polimorfizmus)
- Scw: Soluble cell wall protein (oldható sejtfa fehérje)
- SDS: Sodium Dodecyl Sulphate (nátrium dodecil szulfát)
- SGD: Saccharomyces Genome Database
- SSR: Simple SequenCe Repeats (egyszerű szekvencia ismétlődések)

1. BEVEZETÉS

A hagyományos borkészítési technológia még napjainkban is a spontán erjedést részesíti előnyben, bár már évtizedekkel ezelőtt megkezdődött a starter kultúrák alkalmazása, valamint további, technológiai szempontból sajátos tulajdonságokkal és hatással rendelkező törzsek szelektálása is. Egyik ilyen speciális élesztőgomba csoportot a hártaképző vagy filmképző élesztőként ismert borélesztők képviselik.

A hártaképző borélesztő törzsek sejtjei a mustok alkoholos erjedése után a nagy etanol tartalmú száraz fehérborok felszínén összekapcsolódva úszó biofilmet, úgynevezett „flor”-t (hártát) alakítanak ki, amely a borok biológiai éréséért felelős (Freiberg és Cruess, 1955). A hártában lévő sejtek a borban található etanolt, glicerint és szerves savakat oxidatív metabolizmus (aerob légzés) révén hasznosítják. Anyagcseréjük során jellegzetes aromakomponensek termelődnek (Pham et al., 1996), amelyek nagymértékben meghatározzák a borok karakterisztikus érzékszervi tulajdonságait. Ilyen élesztőhártá alatt érlelődik például a spanyol Sherry, vagy a francia Vin Jaune, de hasonló hártá fejlődik a bor felszínén a magyarországi Tokaji Szamorodni évek alatt történő érlelése során is.

A flor élesztők sejtjei a hártá kialakulása és fejlődése során különböző átalakulások mennek keresztül, így a sejt metabolizmusában is, amely változást okoz a sejtek zsírsav összetételében (Valero et al., 2002). A hártaképzést számos környezeti tényező is befolyásolja, azonban ezek pontos azonosítása még hiányzik. Egyik ilyen fontos tényező a sejtfelszín hidrofób jellege (Iimura et al., 1980a), amely a hártaképzés során növekszik. A hidrofób felszín segítségével összekapcsolódott sejtaggregátumok képesek visszatartani az erjedés során képződött CO₂-ot, amely elősegíti a sejtek felszínre való felemelkedését (Martinez et al., 1997b; Zara et al., 2005). Alexandre és mtsi. (1998) a hártává összeállt sejtek alakjának és méretének változásáról számoltak be.

Az élesztősejtek felszínre történő felemelkedésének pontos mechanizmusa, valamint a sejtek egymáshoz kapcsolódásának módja még nem teljesen ismert, főleg a molekuláris szintű jellemzés hiányzik. A *Saccharomyces cerevisiae* sejtfalfehérjei feltehetőleg fontos szerepet töltenek be a sejtek összekapcsolódásában, a flokkulációhoz hasonlóan, amelynél kimutatták, hogy a sejtfal Flo11 fehérje komponense vesz részt a sejtek aggregálódásában (Bayly et al., 2005). Több kutató

kimutatta a borélesztők, köztük a hártaképzők kromoszóma hosszmeretének és a mitokondriális DNS szekvenciájának polimorf jellegét (Vezinhet et al., 1990; Ibeas és Jimenez, 1997c). Fernandez-Espinar és mtsi. (2000) a flor élesztők riboszómális DNS-ének nem-kódoló régiójában egy 24 bp-os deléciót mutattak ki, Marinangeli és mtsi. (2004b) pedig egy sejtfalfehérjét kódoló gén, a *SEDI* gén nagymértékű polimorfizmusát írták le borélesztők esetén.

A sherry és sherry-típusú borok flor élesztőit különösen a spanyol élesztőkutatók sokoldalúan tanulmányozták és számos nemzetközi publikációban mutatták be eredményeiket. A teljesség igénye nélkül néhány ilyen publikáció: Budroni et al. 2000; Budroni et al., 2005; Espinazo-Romeu et al, 2008; Esteve-Zarzosó et al., 2001; Esteve-Zarzosó et al., 2004; Ibeas et al., 1997a; Martinez et al., 1997a; Martinez et al., 1997b; Mesa et al., 2000. A hazai Tokaji Borvidéken részletesen tanulmányozott Tokaji Aszú mellett a Tokaji Szamorodni érlelésében részt vevő hártaképző élesztők tulajdonságainak kevesebb figyelmet szenteltek. A tokaji borkülönlegességek mikrobiológiai érlelésével az 1950-es években kezdtek foglalkozni, amely során fajélesztővel próbálták az érési időt rövidíteni, illetve a borok minőségét javítani. A Kertészeti Egyetem Borászati Tanszékén az 1970-es években indult meg a hártya alatti borérlelés tanulmányozása Kádár Gyula vezetésével (Kádár et al., 1975), amelynek eredményeként 1975-ben a Gyöngyös-Domoszlói Állami Gazdaság HELIOS néven megkezdte egy sherry-jellegű borkülönlegesség gyártását és forgalmazását. A későbbiekben kísérletek folytak új borkülönlegességek készítésére a borok alkoholtartalmának növelésével, illetve emelt hőmérsékleten történő rövid előérlelés alkalmazásával (Magyar et al., 1983). A biológiai borérlelés kémiai folyamataival és szabályozási lehetőségeivel Panyik és mtsi. (1987) foglalkoztak.

Munkám során célul tűztem ki, hogy az érlelés során jelenlévő élesztőket mélyrehatóbban jellemezzem, és ezáltal hozzájáruljak a biológiai érlelés mechanizmusának jobb megértéséhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Hártyaképző élesztők segítségével készített borok

A spanyol sherry és a francia Vin Jaune híres borkülönlegességek. Jellegzetességüket a kezdeti alkoholos fermentáció utáni, évekig tartó érlelésnek köszönhetik. A hordókban való érlelés alatt az úgynevezett „flor” élesztők fokozatosan kialakítanak egy erős, néha ráncos, viaszzerű hártyát a bor felszínén. Az ebben végbemenő másodlagos anyagcserefolyamat, amely az első főerjedéstől eltérően oxidatív légzés, határozza meg a tipikus flor karaktert. A jó minőségű flor sherry-k esetében az érlelés minimum 4-6 évig tart (Lüthi et al., 1965). A hagyományos spanyol sherry borokon kívül számos más, hasonló klímájú országban [pl. Kalifornia (USA), Szardínia, Dél-Afrika, Ausztrália] is készítenek sherry típusú borokat. A magyar Tokaji Szamorodni is olyan szempontból hasonló ezekhez a borkülönlegességekhez, hogy az alkoholos fermentációt követő hosszú érleléssel készül, melynek során a bor felszínén élesztőhártya alakulhat ki (Magyar, 1998). Azonban míg a Sherry és a Sherry jellegű borok likőrborok, azaz alkoholtartalmukat mesterségesen megnövelik, addig a szamorodni esetében alkohol hozzáadása tilos.

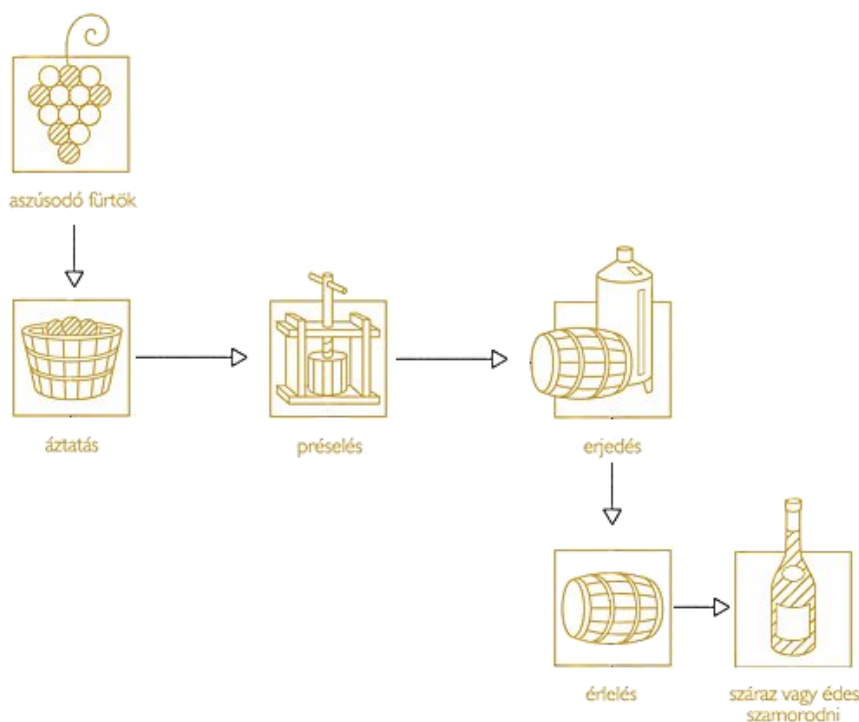
A dél-spanyolországi Montilla-Moriles és Jerez régiókban a fino és az amontillado fehérborok hártya alatti hosszú, 5-12 éves tölgyfahordós érleléssel készülnek. Mindkét bor egyetlen egy szőlőfajta, a *Pedro Ximenez* mustjából azonos körülmények között végzett fermentációval készül, azonban az alkoholos erjedés után eltérő típusú érlelésen mennek keresztül. Ennek eredményeképpen a borok eltérő aromakomponenseket tartalmaznak, amelyek sajátos érzékszervi tulajdonságokkal ruházzák fel a bort.

A *fino sherry borok* többlépcsős, úgynevezett „solera” rendszerben kivitelezett biológiai érlelésen esnek át, amelyet a hártyaképző *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzsek folytatnak le, miután a bor etanol tartalmát nagy (max. 15,5 %) értékre beállították (Cortes et al., 1998; Martinez et al., 1997a). Az élesztőhártya megvédi a bort a barnulástól, így az az érlelés éve alatt megtartja a fino borokra jellemző halványsárga színt (Baron et al., 1997).

Az *amontillado sherry borok* kétfázisos érleléssel készülnek, amely során először a fino borokhoz hasonló biológiai érlelésen esnek keresztül, majd az etanoltartalom jelentős megnövelése (18 %), ezáltal a hártyaképzők gátlása után (Botella et al., 1990) egy oxidatív érlelés következik. Ennek során a fenolos komponensek oxidációjának következtében a bor sötét színt kap (Fabios et al., 2000). A kétfázisos érlelés révén az amontillado borok aromája sokkal összetettebb, mint a fino boroké (Zea et al., 2001).

A francia *Vin Jaune sherry-típusú borok* a Jura régióban készülnek a *Savagnin* szőlőből. A mustot hagyományos borkészítési technikával száraz fehérborrá alakítják, majd a malolaktikus fermentáció után a borok felszínén flor élesztőhártya alakul ki, hasonlóan a fino sherry-hez, azonban az alkoholtartalmat az érlelés előtt mesterségesen nem módosítják. A bor összesen 6 évet és 3 hónapot tölt ugyanabban a tölgyfahordóban a hártya alatt lefejtés nélkül (Charpentier et al., 2004).

A magyarországi *Tokaji Szamorodni* a furmint ill. hárslevelű szőlőfajták *Botrytis cinerea* penészgomba hatására aszúsodott bogyókat tartalmazó fürtjeiből készítik (**1. ábra**). Az aszúsodott szőlőből készült must erjedése során a fermentáció elején a nem-*Saccharomyces* fajok (*Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*) dominálnak, azonban az erjedés előrehaladtával a *Saccharomyces sensu stricto* csoportba tartozó törzsek kerülnek előtérbe (Donèche, 1994). A kezdeti *Saccharomyces* populáció nem homogén, de ez erjedés végére a *S. bayanus* válik dominánsá (Sipiczki et al., 2001).



1. ábra: A tokaji szamorodni készítésének sematikus ábrája.

(<http://www.magyarborokhaza.hu/tokaj.php>)

Az aszúsodásnak köszönhetően a bor jellegzetes illattal és zamattal rendelkezik, valamint az alkoholtartalma viszonylag magas, ha szárazra kierjesztik. A borok érlelését a borok darabban tartásával, fahordókban, legalább 2 évig végzik (Eperjesi, 1998). Az érlelés során a borok felszínén vékony élesztőhártya alakulhat ki. A hártyában a *Saccharomyces cerevisiae* különböző fiziológiai

változatai vannak jelen, ezáltal a Tokaji Szamorodni felszínén hárttyát kialakító élesztők fiziológiai szempontból nagyfokú hasonlóságot mutatnak a jerezi és a jurai borok hárttyaképző élesztőivel (Magyar, 1998). Azonban míg a külföldi flor törzsek nagy mennyiségű sejtömeget termelnek, ezáltal vastag, erősen rácos és stabil hárttyát képeznek, addig a hazai hárttyaképző törzsek vékony, sima felületű, áttetsző, instabil filmet hoznak létre a bor felszínén (Magyar, 1984).

2.2. A *Saccharomyces* nemzetség

A *Saccharomyces* nemzetséghez tartozó élesztők faji besorolása mindig problematikus volt és a nemzetségeket az elmúlt évtizedek alatt folyamatosan átrendezték – fajokat vontak össze vagy új fajokat hoztak létre (Rainieri et al., 2003). Ennek következtében az egyes törzsek és fajok neve számos változáson ment keresztül, ami zavart okozott, mind a kutatók, mind a fermentációs iparban dolgozók számára.

A jelenleg elfogadott rendszer szerint (Vaughan-Martini és Martini, 1998; Naumov et al., 2000; Kurtzman, 2003) a *Saccharomyces* nemzetséghez tartozó fajokat három csoportba sorolják:

Saccharomyces sensu stricto (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. pastorianus*),

Saccharomyces sensu lato (*S. dairensis*, *S. castellii*, *S. exiguus*, *S. servazzii*, *S. unisporus*, *S. barnetti*, *S. spencerorum*) és

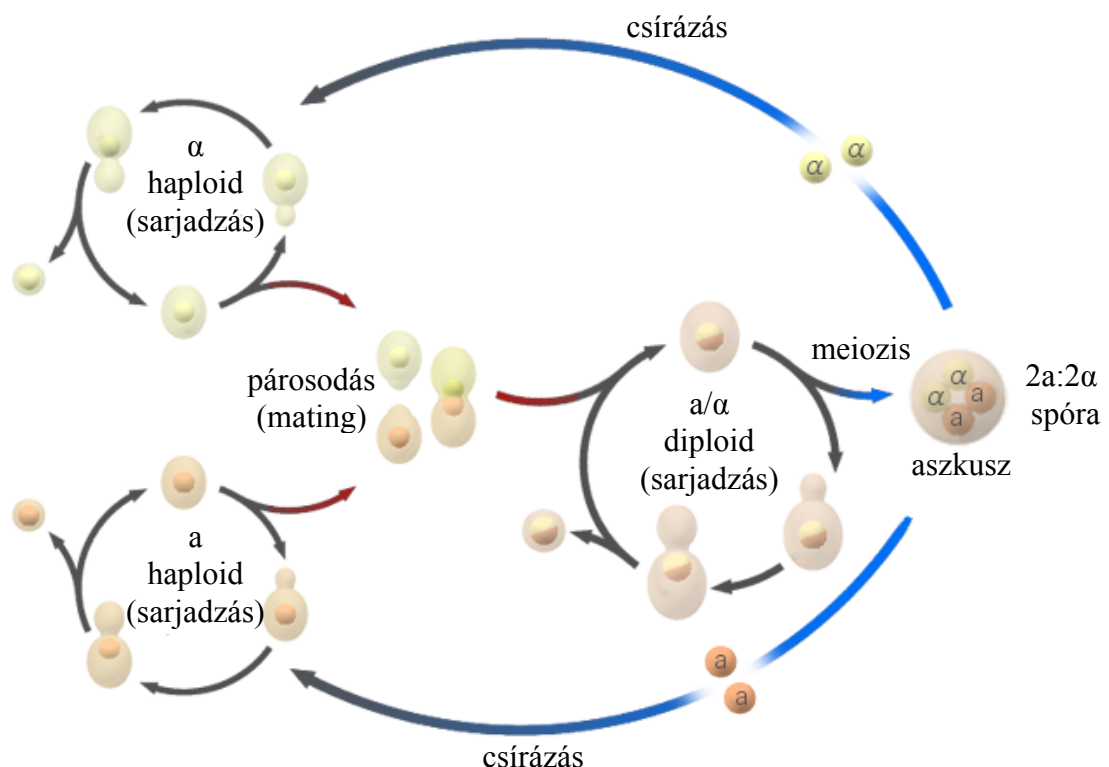
Saccharomyces kluyveri.

A *Saccharomyces sensu stricto* csoport fajtái, főleg a *Saccharomyces cerevisiae*, számos hagyományos ipari folyamatban vesznek részt, és starterként alkalmazzák őket.

A *Saccharomyces sensu stricto* első hat „testvér” fajának megegyező mating-típus rendszere van, ami lehetővé teszi a fajok közötti keresztezést. A keletkező hibridek azonban sterilek, így a képződő spórák nem életképesek. Az intraspecifikus hibridek azonban termékenyek és a kontroll markerek szabályos szegregációját adják (Naumova et al., 2003a). A hetedik *sensu stricto* faj, a *S. pastorianus* pedig a *S. cerevisiae* és a *S. bayanus* hibridje (Naumov, 1996; Vaughan-Martini és Martini, 1998; Naumov et al., 2000). Újabb molekuláris vizsgálati eredmények alapján a *Saccharomyces bayanus* a *S. uvarum* és a *S. cerevisiae* hibridje (de Barros et al., 2002; Nguyen és Gaillardin, 2005), azonban a *S. bayanus* korábban megállapított fiziológiai jellemzői is a hibrid természetire engednek következtetni (Rainieri et al., 1999). A nukleáris és mitokondriális gének kombinált elemzése különösen hatékony a dupla és tripla hibridek jellemzése során (Masneuf et al., 1998), ezért ezek segítségével González és mtsi. (2006) *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* és

S. cerevisiae x *S. bayanus* kettős hibrideket, valamint *S. bayanus* x *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* hármas hibrideket azonosítottak borélesztők esetében. A hibridek jelentőségét növeli, hogy mindkét szülőtől kaphatnak eltérő fiziológiai tulajdonságokat, mint például a *S. cerevisiae*-től az alkohol toleranciát és a *S. kudriavzevii*-től az alacsony hőmérséklet toleranciát, amelyek hozzájárulhatnak a szelektív előnyökhöz. A hibridek jelenlétét számos borvidéken kimutatták, Jeune és mtsi. (2007) *S. cerevisiae*/*S. bayanus* var. *uvarum* hibrideket izoláltak francia borvidékről, míg Sipiczki (2002) a Tokaji borvidéken azonosított hibrid borélesztőket.

A *Saccharomyces sensu stricto* élesztők általában diploidok, és jó tápanyag-ellátottság mellett sarjadzással szaporodnak. A diploid sejtek meiózison is átmehetnek (2. ábra), amelynek eredményeként 1-4 askospóra képződik az askusszá átalakult anyasejtben. A meiózis az eukarióta sejtekre jellemző hagyományos sémát követi. A *S. cerevisiae* esetében a nitrogénszegény tápközegen való éhezés és a fermentálható szénforrások hiánya elősegíti a meiózist és a spórázást, habár egyes *Saccharomyces sensu stricto* törzsek képesek jó tápanyag-ellátottság mellett is a spóráképzésre (Rainieri et al., 2003).



2. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* életrciklusa

(http://commons.wikipedia.org/wiki/Image:Budding_yeast_Lifecycle.png)

Különböző tanulmányok kimutatták, hogy a *sensu stricto* fajok filogenetikailag közel állnak egymáshoz. Az elektroforetikus kariotipizálás (Naumov et al., 1992), a mtDNS restrikciós analízise (Guillamón et al., 1994), a riboszómális DNS szekvencia analízise (Kurtzman és Robnett, 1991) és a riboszómális DNS ITS és IGS régióinak RFLP analízise (Montrocher et al., 1998) kimutatta, hogy a *S. cerevisiae* és a *S. paradoxus* nagyon közel álló fajok. A RAPD-PCR analízis megerősítette egyrészt a *S. cerevisiae* és a *S. paradoxus*, másrészt a *S. bayanus* és a *S. pastorianus* közötti közeli kapcsolatot (Fernandez-Espinar et al., 2003). Naumov és mtsi. (2000), valamint Naumova és mtsi. (2003b) tanulmányai alapján a *S. cariocanus* a *S. cerevisiae* és a *S. paradoxus* fajokhoz áll közel, míg a *S. kudriavzevii* és a *S. mikatae* elkülönülő klasztert alkotnak. A *sensu stricto* komplexen belül legjobban a *S. bayanus* faj különül el (Naumov et al., 2000; Montrocher et al., 1998), a legheterogénebb faj pedig a *S. cerevisiae* (Naumova et al., 2003b).

2.3. Hártyaképző élesztők fiziológiai változatai és faji diverzitása

A hagyományos taxonómia az élesztők faj szintű elkülönítésére morfológiai és fiziológiai tesztek alkalmazását használja. Annak ellenére, hogy e hagyományos módszereket még most is elterjedten alkalmazzák az élesztők azonosítására és rendszerezésére, ez nem ad lehetőséget a *Saccharomyces* fajok egyértelmű elkülönítésére. Ennek az a magyarázata, hogy az élesztők morfológiai és fiziológiai tulajdonságai nem stabilak és gyakran változnak nemcsak fajok között, de a fajokon belül is (Rainieri et al., 2003).

A sherry típusú borok készítésekor, a bor felszínén kialakult hártyából izolált törzseket Sancho és mtsi. (1986) öt fajba különítették el, amelyeket az akkor érvényes taxonómia alapján (Lodder, 1970) a *S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. capensis*, *S. aceti* és *S. bayanus* fajokhoz sorolták. Ezek a hártyaképző fajok ma már valamennyien a *S. cerevisiae* fajhoz tartoznak (Barnett et al., 2000). Sancho és mtsi. (1986) az öt faj közül az anaerob fermentáció alatt a *S. cerevisiae*-t találták a dominánsnak. A fermentáció befejeződésével csak azok a törzsek képesek tovább szaporodni, amelyek felemelkednek a folyadék felszínére. Ezen törzsek valószínűleg az évszázados szelekció eredményei, amelyek jobban adaptálódtak a bor felszínén való növekedéshez. A fermentációs tartályokban kialakuló hártyában a *S. cerevisiae* és a *S. chevalieri* fordult elő legnagyobb hányadban, míg a hordókban képződött hártyában a *S. capensis*.

A jelenleg érvényes besorolás alapján a sherry borok érlelésében részt vevő hártyaképző élesztők a *Saccharomyces cerevisiae* fajhoz, annak négy különböző fiziológiai változatához tartoznak (*beticus*

[korábbi *capensis*]; *cheresiensis* [korábbi *bayanus*]; *montuliensis* [korábbi *aceti*] és *rouxii*) (Esteve-Zarzoso et al., 2004). Korábban csak az első három változatot tekintették a *Saccharomyces cerevisiae* szinonimáinak, míg a *rouxii* változatot a *Zygosaccharomyces rouxii* fajhoz sorolták, azonban később molekulárisan módszerek segítségével kimutatták, hogy ez a változat is a *Saccharomyces cerevisiae*-hez tartozik (Esteve-Zarzoso et al., 2004). Annak ellenére, hogy a flor élesztőket a *Saccharomyces cerevisiae* fajhoz sorolják, a sherry borok biológiai érlelésével foglalkozó tanulmányok megtartják a flor élesztők fiziológiai tulajdonságokon alapuló négy változatának elkülönítését, ugyanis a különböző változatok előfordulásának aránya fontos tényező a sherry borok végső jellegének kialakításában. Martinez és mtsi. (1995) például az egyes *S. cerevisiae* változatok és a jelentős acetaldehid termelés közötti összefüggésre mutattak rá, továbbá kapcsolatot találtak a hártyaképzéshez szükséges idő és a domináns flor élesztő változatok között is (Martinez et al., 1997a).

A flor élesztők *S. cerevisiae* különböző változataihoz való besorolását az eltérő szénhidrát fermentációs képesség alapján lehet elvégezni. Budroni és mtsi. (2005) vizsgálatai alapján a flor élesztők 73 %-a nem fermentálja és asszimilálja a galaktózt, ez az arány a maltózt esetében 69 %. Johnston és mtsi. (2000) tanulmánya alapján a GALo fenotípus a *GAL7*-es vagy a *GAL10*-es génben bekövetkezett mutáció következménye. A gének a II. kromoszómán helyezkednek el és közel vannak legalább öt olyan ORF-hez, amelyek hajlamosak a meiosis indukálta kétszálú törésre. A GALo fenotípus kb. 75 %-ban jellemző a flor élesztőkre, míg a nem flor élesztőkre csak 39 %-ban. Naumov és mtsi. (1994) kimutatták, hogy a borélesztőkben csak két *MAL* lokusz van (*MAL2* és *MAL3*), amelyek a VII-es és a II-es kromoszómán helyezkednek el. A flor élesztők 73 %-a nem képes hasznosítani a maltózt (MALo fenotípus), míg a nem-flor élesztőknél ez az arány csak 9 %. Ha figyelembe vesszük, hogy a flor élesztők nagy mennyiségű acetaldehidet termelnek a bor érése során, ami az egyik fő oka a duplaszálú törésnek és egyéb kromoszóma átrendeződésnek (Ristow et al., 1995), feltehető, hogy a GALo és a MALo fenotípusok a nagy acetaldehid koncentráció kiváltotta DNS károsodás következményei (Budroni et al., 2005).

2.4. Az élesztőgombák killer rendszere

Számos élesztő képes antimikrobás aktivitással rendelkező exotoxinok termelésére. Azokat az exotoxinokat (általában fehérjék vagy glikoproteinek), amelyek képesek az azonos vagy közeli rokon fajokat elöltni, killer toxinoknak hívják. A killer élesztők a saját killer toxinjukra immunisak. A killer tulajdonságot számos élesztő nemzetség és faj esetében kimutatták. A *Saccharomyces*

cerevisiae killer törzseit a kiválasztott toxin molekuláris tulajdonságai, a toxin hatásmechanizmusa és a kereszt-érzékenység alapján három csoportba lehet sorolni (K1, K2 és K28). A killer toxinokat az élesztősejtek az exponenciális fázisban termelik és főleg az azonos fázisban lévő érzékeny sejtekre vannak hatással megfelelő tápanyag-ellátottság és kis pH értékek esetében (Magliani et al., 1997). A borok spontán fermentációjában részt vevő élesztők jelentős része rendelkezik killer tulajdonsággal (Shimizu, 1993). A killer borélesztő *S. cerevisiae* törzsek többsége a K2-es killertoxin termelő csoporthoz tartozik. Érdekes jelenség, hogy míg a hártaképző élesztők különböző fiziológiai változatai közül a *S. cerevisiae* var. *montuliensis* és a var. *rouxii* nem termelnek toxint, és érzékenyek mind a K₁, mind a K₂ killer toxinra, addig a *S. cerevisiae beticus* és a *cheresiensis* változatai annak ellenére, hogy nem-termelők, rezisztensek mindkét toxinra (Martinez et al., 1995).

2.5. A hártaképző borélesztők spórázási képessége

A fermentáció utáni szelekcióban számos tényező, mint pl. a hártaképzés képessége fontos szerepet játszik. A szelekcióban a törzsek ivaros izolációja is részt vehet. Nyilvánvaló, hogy eltérő fajok között kialakulhat ivaros izoláció, de ez kialakulhat akkor is, ha az ivaros szaporodás ritka. A *S. cerevisiae* fajon belüli ivaros izoláció egyik oka lehet a múltban feltételezett sok fajnak (Sancho et al., 1986).

Mortimer és mtsi. (1994) kimutatták, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* borélesztők 69 %-a homotallikus, és javasolták a „genom megújulás” modellt ezekre a törzsekre. A modell szerint a homotallikus jelleg, a spórázással együtt a borélesztők számára olyan szelekciós tényező, amely lehetőséget ad az evolúciónak a kedvező tulajdonságok kisselektálására. A *Saccharomyces cerevisiae* heterotallikus borélesztő törzseinek haploid generációi pedig önmagukban nem képesek diploidokat képezni a *HO* génben bekövetkezett mutáció következtében. Egyes kutatások a flor élesztőknél egy harmadik típusú, úgynevezett szemi-homotallikus életciklust is kimutattak (Budroni et al., 2000), amelyet egy szabálytalan szegregáció jellemez, két párosodásra képes (*MATa* vagy *MATα*) és két párosodásra nem képes (homotallikus) szegregánsokat eredményezve.

A borélesztő törzsek spórázó képessége, valamint a spórák életképessége törzsenként nagyon eltérő, 0-98 % között változik (Ristow et al., 1995; Guijo et al., 1997; Querol et al., 2003). A borélesztőkön belül a flor élesztők általában jóval kisebb arányban spóráznak, mint a nem-flor élesztők. Guijo és mtsi. (1997) vizsgálatai szerint a hártaképző törzsek spórázási képessége 6,2-30,6 %. A spórázás során kialakuló aszkuszokban 1-4 spóra található és a spórák életképessége

nagyon kicsi, általában 1 spóra/aszkusz. Santa Maria és Vidal (1973) a diploid hártaképző törzsek spóráztatása után a haploid spórák esetében a flor képzés Mendeli módon történő szegregálódását figyelték meg, ezt azonban Guijo és mtsi. (1997), valamint Jimenez és Benitez (1987) vizsgálatai nem támasztották alá. Érdekesség, hogy a Martinez és mtsi. (1995) által vizsgált flor élesztők nem voltak képesek spórázni.

Az aszkuszokban a spórák kis életképességét számos tényező okozhatja. A spórák életképessége nem növelhető a tápközeg ozmotikus stabilizálásával, ami arra utal, hogy ez nem a spórafalban fellépő „hibának”, hanem az abnormális kromoszóma állománynak köszönhető (kromoszómavesztés, duplikáció, átrendeződés) (Sancho et al., 1986).

2.6. A környezeti tényezők hatása a hártaképzésre

A sherry borok érése alatt a bor felszínén kialakuló hártya (flor) a flor élesztők adaptációs mechanizmusa, amely magába foglalja a sejtek méretének, alakjának és hidrofób jellegének változását. A hidrofóbiának köszönhetően a sejtek aggregálódnak, így képesek visszatartani a keletkező gázbuborékokat, aminek következtében az aggregátumok fajsúlya kisebb lesz, mint a boré. Ez azt eredményezi, hogy az aggregátumok képesek a sherry felszínén lebegni és növekedni (Martinez et al., 1997b).

A must alkoholos fermentációja során a sejtek kerek, kisebb méretűek, mint a hártában. A hártában a sejtek mérete növekedik, valamint a sejtek megnyúlnak. A sejtek szerkezetét tanulmányozva csak az erjedő mustból vett sejteknél lehetett megfigyelni, hogy a sejtfa kissé vastagabb. Egyik sejtben sem találhatóak vezikulumok, vagy speciális szerkezetek. A mitokondriumok számát Martinez és mtsi (1997b) mind az erjedés, mind a hártaképzés során azonosnak találták. Magyar (1984) a hártában lévő sejtek esetében nagyszámú mitokondrium jelenlétéről tudósított, a főerjedésben résztvevő élesztősejtek mitokondriumait azonban nem vizsgálta. Jelentős mennyiségben talált lipidzárványokat is a sejtekben.

A filmképzés ideje a filmben dominánsan jelenlévő törzsektől függ. A *Saccharomyces cerevisiae* var. *beticus* és a var. *cheresiensis* gyorsabban képez hártát, mint a *Saccharomyces cerevisiae* var. *montuliensis* és a var. *rouxii*. Az etanoltartalom erősen befolyásolja a szaporodást és a hártaképződés idejét. Azok a törzsek (*beticus* és *cheresiensis* változatok), amelyeknél a fajlagos szaporodási sebesség értéke drasztikusan csökken, azaz érzékenyebbek a nagy etanol

koncentrációra, gyorsabban reagálnak az etanol jelenlétére azáltal, hogy gyorsabban felemelkednek a felszínre és hártát képeznek. Egyik törzs sem képes azonban nagyobb, mint 15 % etanol tartalomnál szaporodni, viszont ha a sejtek túlélnek a nagy etanol koncentrációt és megtartják működőképes mitokondriumukat, míg eléri a folyadék felszínét ott képesek hártát alkotni. Így elmondható, hogy a hártaképzés a borélesztők alkalmazkodása a nagyobb (15 % feletti) etanol tartalmú borokban való növekedéshez. A borok felszínén való növekedés lehetővé teszi az oxidatív metabolizmust, ezáltal a borokban jelenlévő nem fermentálható szénforrások (etanol, glicerin) hasznosítását (Martinez et al., 1997b).

A sherry-típusú borok nagy etanol koncentrációja közel van a borélesztők felső tolerancia szintjéhez (Jimenez és Benitez, 1987; van Uden, 1985), így azon környezeti tényezők változása, amelyek hatással lehetnek az etanol toleranciára, károsíthatják a hártá alatti érés folyamatát. Laboratóriumi körülmények között kimutatták, hogy a hőmérséklet növelésével csökken az élesztősejtek etanol tűrése (Ibeas et al., 1997a; Jimenez és Benitez, 1988; van Uden, 1985). Az élesztők számára a 16 % feletti etanol tartalom toxikus. A hagyományos sherry készítési technikák során a borok alkoholtartalmát 15 % körülre növelik. Az érlelés hőmérsékletének ingadozása a hártá állapotának romlását, lesüllyedését vonja maga után, ami különösen nyáron jelentkezik veszélyként. A hártá állapotának romlása összefügg a légzésdeficiens (ρ^-) mutánsok arányának növekedésével. Ezek a mutánsok nem képesek hártát képezni, ami azt jelzi, hogy az oxidatív metabolizmus nélkülözhetetlen az élesztők számára a flor kialakításához. Azonban ha az élesztőhártá már kialakult, a hártában lévő sejtek 100 %-ának ρ^- mutánssá válása nem befolyásolja a hártá stabilitását, tehát a hártá egy hosszúéletű biológiai szerkezet 20 °C-nál kisebb hőmérsékleten. Mivel a sherry borban keletkező ρ^- sejtek nem okozzák közvetlenül a hártá szétesését, a légzésdeficiens mutánsok megjelenése nem lehet az egyedüli oka a hártá dezorganizációjának (Ibeas et al., 1997b).

Laboratóriumi kísérletekben kimutatták, hogy az etanol a mitokondrium genomra mutagén hatású (Bandas és Zakharov, 1980), amely hatást a nagy hőmérsékleten való inkubálás növeli (van Uden, 1985). Ez a mutagén hatás a légzésdeficiens mutánsok gyakoriságának emelkedésével követhető nyomon. A hő-tolerancia és az etanol-tolerancia genetikailag kódolt tulajdonságok, amelyek törzsfüggek. Ibeas et al. (1997b) kísérletei szerint a kritikus hőmérséklet 22,5 °C 15 %-os etanol tartalom mellett.

Különbözö eljárásokat dolgoztak ki a hártá védelmére a nyári periódus alatt. Egyik ilyen lehetőség a környezeti tényezők optimálása a flor élesztők számára, a pincék klimatizálásával, vagy a sherry borok etanol tartalmának csökkentésével. Az etanol tartalom 0,5 %-kal való csökkentésével a hártá minősége javítható a nyár során, azonban ilyen körülmények között szennyező, *Dekkera* élesztők

jelenhetnek meg a flor élesztők mellett, ami a sherry borok biológiai érlelését kockázatosná teszi 15 % alkohol tartalom alatt (Ibeas et al., 1997b).

Egyes esetekben a hártya kialakulása illetve kifejlődése gátlódik a boron, ami a kedvezőtlen tápanyag ellátottsággal magyarázható (Fornachon, 1953; Crowther és Truscott, 1955).

Fornachon (1953) tudósítása szerint a „flor” élesztők az etanol mellett a borok egyéb szén-forrásait is képesek hasznosítani. Vizsgálata szerint mesterséges táptalajban a glicerín, a tejsav, a glükóz és a fruktóz kielégítő szénforrásnak bizonyult, míg az ecetsav, a borkősav, az almasav és a citromsav kevésbé volt jó tápanyagforrás.

Fiziológiailag a *S. cerevisiae* sherry borélesztők az aminosavak, nukleotidok és bázisok tekintetében prototrófok, azonban a biotinra auxotrófok, kivéve a *rouxii* változatot, amely a biotin mellett inozit auxotrófiát is hordoz. A hártyaképzők nitrogén igényéről Freiberg és Cruess (1955) részletes vizsgálatot végeztek. Eredményeik alapján a nitrogén minősége és nem feltétlenül a mennyisége a meghatározó tényező. Az élesztőkivonat nagyon jó nitrogénforrás, de valószínűsíthető, hogy ez a hatás az élesztőkivonatban található egyéb komponenseknek (pl. vitaminoknak is) köszönhető. Az élesztőhártya hozamra gyakorolt kedvező hatása ellenére az élesztőkivonat borászati alkalmazása a hártyaképződés elősegítésére kedvezőtlen tápanyag összetétel esetén sem ajánlatos jellegzetes aromája miatt. Az élesztőkivonat kedvező hatása azonban felveti a járulékos növekedési faktorok kérdését a nitrogénforrás mellett. Egy másik, gyakran alkalmazott nitrogénforrás, a pepton is erősen növeli a hártyaképződést. A pepton jó aminosav és ásványianyag forrás, feltételezhető, hogy ez is hozzájárul a hártya növekedéséhez. Hasonló jó eredményt értek el urea alkalmazásával is, azonban mivel a rákkeltő etilkarbamát prekursoraként szerepelhet, alkalmazása tiltott. Szervetlen nitrogénforrásként pedig az ammónia (mind foszfát mind szulfátsó formában) bizonyult kedvezőnek a hártyaképződés szempontjából. Az ammónium-szulfát borászati alkalmazása megfelelő lehetne, mivel olcsó, nem befolyásolja a bor aromáját és remek nitrogénforrásnak bizonyult a hártyaképzéshez.

Vizsgálatok kimutatták, hogy szintetikus tápközeg aminosavak és vitaminok nélkül nem alkalmas hártyaképzésre (Castor és Archer, 1957). Az aminosavak hatását vizsgálva megállapították, hogy egyes aminosavak (cisztein, glicin, hisztidin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, tirozin vagy valin) alkalmazása nem elégséges a hártyaképzéshez, hat aminosav (aszparaginsav, glutaminsav, izoleucin, szerin, treonin vagy triptofán) adagolása azonban kismértékben elősegíti a hártyaképzést, míg két aminosav (arginin vagy prolin) esetében elég jó hártyaképződés figyelhető meg. Ezek az eredmények figyelemreméltóak, ugyanis megállapították, hogy a fiatal borokban a legnagyobb

mennyiségben az aszparaginsav, a prolin, a szerin és a treonin található meg, amelyek mindegyike alkalmas a hártaképződés indukálására.

A vitaminok iránti igényt vizsgálva a pantotenát bizonyult egyedül esszenciálisnak, hiánya esetén a hártaképzés elmaradt. A pantotenát felépítésében részt vevő β -alanin hatását vizsgálva elmondható, hogy a pantotenátot a β -alanin képes pótolni, az α -alanin azonban nem. Ezek az eredmények előtérbe helyezik az ecetsav metabolikus hasznosítását a hártaképzők által, ugyanis a pantotenát illetve a β -alanin szükségessége azt feltételezi, hogy a mikroba a pantotenátot a KoenzimA szintéziséhez hasznosítja (Castor és Archer, 1957). Freiberg és Cruess (1955) tanulmánya alapján a vitaminok közül az aszkorbinsav (C-vitamin) kimondottan kedvezőtlen hatással van a hártaképződésre, ugyanis azt teljesen gátolja, feltételezhetően az aszkorbinsav erős redukáló tulajdonsága miatt, ugyanis a hártaképződés oxidatív folyamat.

2.7. A *Botrytis cinerea* és anyagszere termékeinek hatása az aszúsodó szőlőbogyóra, a mustra és a borra

A botritiszes nemesrothadást, azaz aszúsodást a *Botrytis cinerea* metabolizmusának biokémiai folyamatai, valamint a szőlő tőkén való száradásának, töppedésének egyszerű fizikai változásai együttesen eredményezik.

A nemesrothadás következtében kialakuló stresszhatások befolyásolhatják a Tokaji Szamorodni érlelésében részt vevő hártaképző élesztők szaporodását, hártaképzését és anyagszere-folyamatait, ami jelentős eltérést jelent a sherry és sherry-típusú borok biológiai érleléséhez képest. A bogyó oldott anyagaiban az aszúsodás következtében nagymértékű bekonzentrálódás történik. A koncentráció hatására a szőlő cukortartalma a *Botrytis* cukorfogyasztása ellenére jelentősen megnő, 350-600 g/l körüli értékeket ér el (Donèche, 1994; Magyar, 1998). A *Botrytis* metabolizmusának következtében a glükóz/fruktóz arány 1 alá csökken. Ez a csökkenés az erjedés során is folytatódik a fermentációt végző élesztők glükofil anyagszerjének következtében. A glükóztartalomhoz képest nagyobb fruktóztartalom a borok édességérzetét fokozza. A *Botrytis* az egyéb hexózok és pentózok mennyiségét is növeli a szőlőbogyó poliszacharidjainak és pektinanyagainak lebontásával (Magyar, 1998).

A *Botrytis* cukoroxidációjának során jelentős mennyiségű glicerín és glükonsav képződik. Az aszúmustok glicerintartalma általában 10-30 g/l, glükonsavtartalma 1-3 g/l között változik. A glicerintartalom az erjedés során tovább emelkedik, a glükonsavtartalom viszont nem változik (Magyar, 1998). A glükonsav jelenléte számos problémát okoz a borkészítés során, mint pl. a mikrobiológiai stabilitás vagy a nagy SO₂ megkötő képesség (Barbe et al., 2002; Peinado et al.,

2003a). A glükonsav metabolizmus egyes élesztőkben az aerob anyagcseréhez és glicerin jelenlétéhez kapcsolódik (Peinado et al., 2003b). Ez a két feltétel a sherry típusú borok érlelése során érvényesül (Cortes et al., 1998), ezáltal a glükonsav koncentráció a biológiai érlelés során csökken. A glükonsav mellett a *Botrytis* kisebb mennyiségben glükuron- és galakturonsavat, valamint galaktársavat is termel (Donèche, 1994; Magyar, 1998).

A *Botrytis* az aszúsodás során a szőlő savait jelentős mértékben hasznosítja. A borkósav felhasználása elérheti a 70-90 %-ot, míg az almasav mennyiségének csökkenése kisebb mértékű (50-70 %) (Donèche, 1994). A cukortartalom mellett a jellegzetes, ún. botritiszes illat- és zamatanyagok is fontosak a keletkező bor aromája szempontjából, amelyek kémiai összetétele még nem teljesen feltárt. A szőlő főbb fenol komponenseit (kávéssav és p-kumársav) a *Botrytis* lakkáz enzime kinonokká alakítja át. A szőlő aroma komponensei is jelentős változásokon mennek keresztül. A *Botrytis* termelte glükozidázok elhidrolizálják a terpén-glikozidokat, de bekövetkezik a szabad terpenoidok oxidációja, illetve egyes aldehidek alkohollá történő redukciója is (Donèche, 1994). A *Botrytis* aminosav-felhasználása következtében viszonylag alacsony a C₃-C₅ alkoholok mennyisége (Magyar, 1998). A *Botrytis* emellett számos speciális illékony komponenst termel, mint pl. a furfural, a benzaldehid, a fenilacetaldehid és a benzilcianid (Kikuchi et al., 1983). Az aszúborok mézre emlékeztető illatában kulcsszerepe van a szotolon nevű laktonnak (Magyar, 1998). A *Botrytis* a nemesrothadás során számos fitotoxikus aktivitású poliszacharidot és különböző, antibiotikus hatású vegyületeket képez, amely a *Botrytis* által okozott változások mellett a must lassú erjedését okozzák.

2.8. Hártyaképző élesztők anyagcsere tevékenységének hatása a borra

Hagyományosan a sherry borokat a dél-spanyolországi borvidékeken készítik, gyakran a mustnak vagy a bornak szelektált hártyaképző élesztőtörzsszel való beoltásával. A biológiai érlelés alatt kialakul a sherry borok tipikus aromája. A pince hőmérséklet ingadozásának következtében, a hártya egy része a borba lesüllyed, és a hordó aljában fokozatosan nagymennyiségű üledék halmozódik fel, amelyben a sejtek autolizálnak. Az öregebb hártyán keletkező rések pedig új sejtekkel pótlódnak. Az élesztők szaporodása és autolízise tehát egymással párhuzamosan történik.

2.8.1. Makromolekulák felszabadulása az érlelés során

Korábban már tanulmányozták a habzóborok, illetve a seprőn hagyott fehérborok érlelése alatt az élesztő autolízise során felszabaduló makromolekulákat (Feuillat és Charpentier, 1982).

Charpentier és mtsi. (2004) részletesen tanulmányozták a flor élesztők által a borba kibocsátott makromolekulákat a hártvaképzés során. Az érlelés alatt a sejtek által képzett biomassa többszörösére nő. A legjelentősebb növekedés az érlelés elején következik be. Ugyanezen periódus alatt, az élesztők életképessége csökken a nagy etanol tartalom és a bor kis pH értéke miatt kialakuló stresszhatásnak köszönhetően (Ibeas et al., 1997b; Mauricio et al., 2001). Az életképesség ezután azonban az érlelés végéig konstans marad.

A kiindulási bor makromolekula tartalma az érlelés végére kb. háromszorosára nő. A makromolekulák felszabadulása a hártva kialakulása alatt viszonylag alacsony. A poliszacharidok felszabadulása az élesztők növekedése közben történik, ez a sarjadzás során a sejtfal kontrollált hidrolízisének tudható be (Charpentier et al., 1986), amikor is az anyasejt falának „fel kell lazulnia”, hogy megtörténhessen az új sarj kiemelkedése (Fleet, 1991). Erős növekedés tapasztalható a makromolekulák szintjében a hártva lesüllyedésekor is. A makromolekulák felszabadulása a hártvában szaporodó sejtek, valamint az üledékben található holt sejtek autolízise által történik (Charpentier és Feuillat, 1993).

A felszabadult makromolekulák glikoproteinek, amelyek 73,3-78,5 %-os neutrális cukor és 0,92-1,21 % nitrogén tartalommal rendelkeznek, az érés szintjétől függően. Az érés során a glikoproteineket felépítő aminosavak aránya nem változik lényegesen. Az aminosavak 65 %-át az Asx (aszparagin és/vagy aszparaginsav), a Glx (glutamin és/vagy glutaminsav), a szerin, a treonin és az alanin teszik ki. Magas alifás aminosav tartalom figyelhető meg, főleg a hidroxilált szerin és treonin aminosavak mennyisége nagy, amelyek általában az élesztő mannoпротеinek O-glikozidos kötéseiben vesznek részt (Ballou, 1976). Az N-glikozilálás lehetséges helye, az aszparagin, szintén nagy mennyiségben fordul elő.

Az érlelés előtti borban főleg mannóz (64 %) és galaktóz (26 %) található, de kevés glükóz (5 %) és arabinóz (3 %), nyomokban pedig ramnóz (1,5 %) is kimutatható. Ezek a szőlőből származó makromolekuláknak felelnek meg – pektinek, arabánok, és ramnogalaktánok. Az érlelés alatt a mannóz és glükóz tartalom növekedik, 75 illetve 17 %-os arányt is elérve az érlelés végére. Ezek az eredmények az élesztő sejtfal eredetű mannoпротеinekre utalnak. A mannózt tartalmazó polimerek kiválasztása együtt járt a glükózt tartalmazó polimerek kiválasztással. A mannóz/glükóz arány a hártva kialakulása során élesen csökken (-48 %), ugyanis a növekedő sejtek által kiválasztott makromolekulák glükóz tartalma nagy. Az érlelés előrehaladtával a hártva lesüllyedése, majd az új hártva kialakulása során a mannóz/glükóz arány kisebb ütemben csökken (-12 %). Ilyenkor nemcsak az élő, hanem a holt sejtek (az élesztők 10 %-os életképessége miatt) is bocsátanak ki makromolekulákat. Feltételezhető, hogy a szaporodó és a holt sejtek által kibocsátott

mannoproteinek különböznek. Továbbá a kiválasztott mannoproteinek glükóz polimerjeit az élesztők által borba kiválasztott glükánázok hidrolizálhatják (Charpentier et al., 2004).

2.8.2. A borok kémiai összetételének alakulása az érés során

A borok illata és aromája főleg a must típusán és minőségén, valamint a feldolgozás módján múlik. Azonban a *Saccharomyces cerevisiae* flor élesztők oxidatív metabolizmusának következtében a biológiai érlelés során megváltozik a borok kémiai összetétele, valamint új aroma komponensek is keletkeznek.

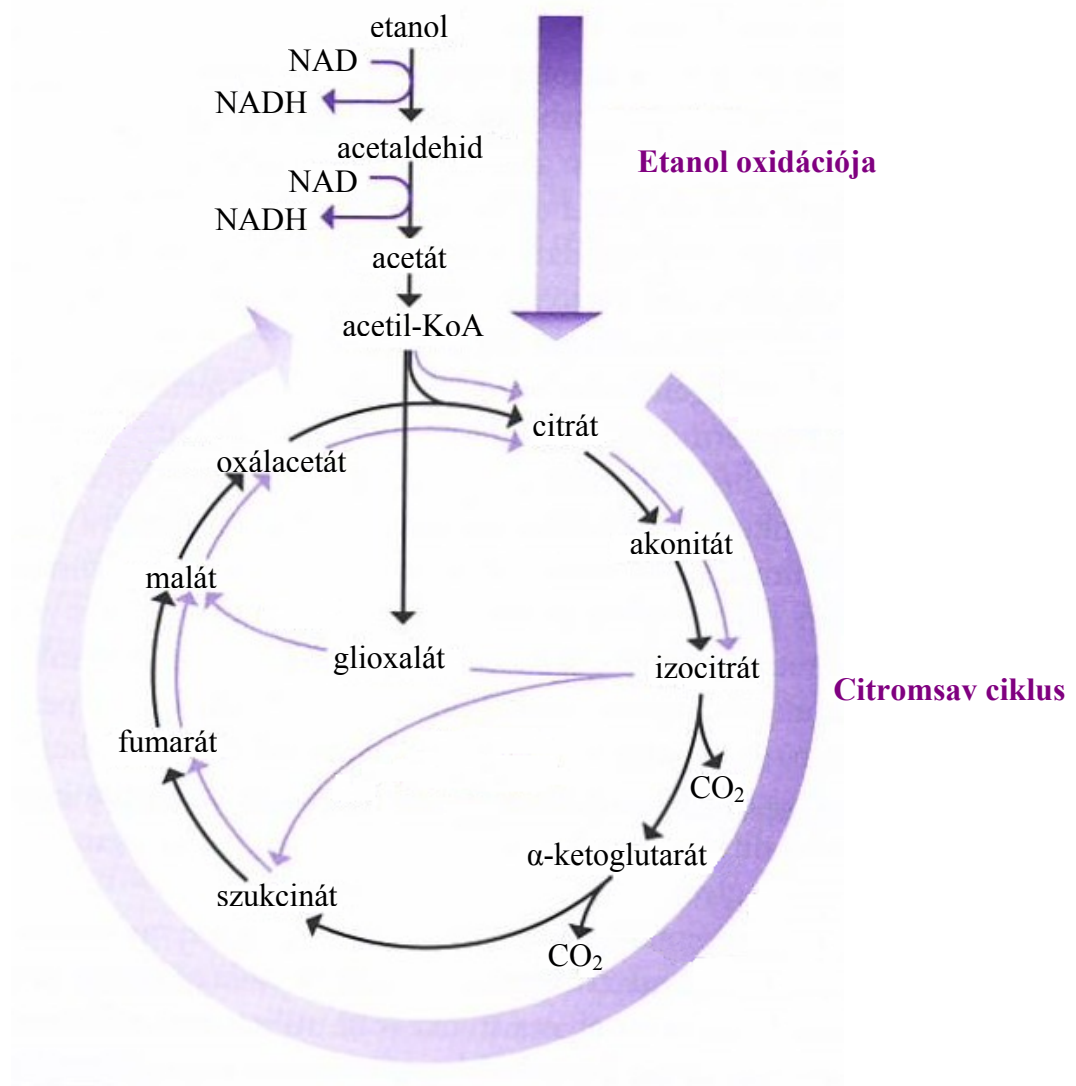
Napjainkban a legtöbb must erjesztését válogatott *S. cerevisiae* vagy *S. bayanus* törzsek beoltásával végzik. A starter kultúra alkalmazása nagyban csökkenti mind az egyéb élesztőgomba törzsek számát, mind a fermentáció beindulásához szükséges időt, ezáltal csökkenve a bakteriális befertőződés esélyét és a nem-*Saccharomyces* élesztők káros tevékenységének hatását. Mindemellett azonban a természetes mikrobióta metabolikus aktivitása is befolyásolja a bor végső érzékszervi tulajdonságait (Reed és Nagodawithana, 1991).

A biológiai érlelés során, az élesztők oxidatív metabolizmusában az etanol a fő energiaforrás, amelyet az élesztők az alkohol-dehidrogenáz segítségével acetaldehiddé, majd acetáttá oxidálnak, és az acetyl-KoA formában a citromsav ciklusba lép (**3. ábra**), végül szén-dioxiddá és vízzé oxidálódik redukált koenzimek képződése mellett. A folyamatban nem az alkoholos erjedésben résztvevő citoplazmás enzim, hanem egy induktív alkohol-dehidrogenáz vesz részt, amely a mitokondriumban található és glükóz represszió alatt áll. Az etanol mellett a glicerín is jelentős tápanyagforrás, amit a flor élesztők szintén hasznosítanak (Cortes et al., 1998; Cortes et al., 1999). A glicerín foszfátészter formájában dihidroxiaceton-foszfáttá, majd glicerinaldehid-foszfáttá alakul, ami a glikolízis és a citromsav kör lépéseiben oxidálódik tovább.

Az etanol fogyasztás szintje az érlelés elején a legnagyobb. Ez annak tulajdonítható, hogy a hártvaképzés – ami az érlelés elején következik be – energia igényes (Martinez et al., 1997c), és a legjobb rendelkezésre álló szénforrás az etanol. A sherry érlelésénél eltérések mutatkoznak az egyes *S. cerevisiae* változatok esetében. Az összes etanol fogyasztás a *S. cerevisiae* var. *montuliensis* és var. *rouxii* esetében nagyobb, mint a *S. cerevisiae* var. *beticus* és var. *cheresiensis* esetében. A glicerín fogyasztás az érlelés során egyenletes. A glicerín csökkenés a sherry borban az 50 %-ot is elérheti. Az etanol koncentráció emelésével a glicerín fogyasztása csökken. A *S. cerevisiae* var.

montuliensis esetében a glicerín asszimiláció szintje nagyobb, mint a var. *beticus* esetében (Martinez et al., 1998).

A szerves savak (citromsav, glükonsav, almasav, borostyánkősav, tejsav, ecetsav) mennyisége az érlelés során csökken. Míg a citromsav és a borostyánkősav mennyisége fokozatosan csökken az érlelés során, addig a glükonsav, a tejsav és az almasav koncentrációja kezdetben nem változik, a csökkenés csak az érlelés későbbi fázisában következik be. A sherry borokban az összes illósav tartalom az érlelés végére minimális értékre csökken. A fogyasztás a *S. cerevisiae* var. *beticus* és a var. *cheresiensis* esetében nagyobb, mint a var. *montuliensis* és a var. *rouxii* esetében. Minden változat esetében azonban az összes illósavban bekövetkező fogyasztás szintje az érlelés elején nagyobb, majd a minimális fogyasztási szint elérése után kismértékű ingadozást lehet csak megfigyelni. Az ingadozás az etanol ecetsavon keresztül történő metabolizálásával magyarázható (Martinez et al., 1998).



3. ábra: Az etanol oxidációja és a citromsav ciklus (Thuriaux, 2004)

Az érlelés hatására a legjellegzetesebb változás az acetaldehid tartalomban következik be, ugyanis az alkohol biológiai oxidációja során köztes termékként acetaldehid keletkezik, melynek egy része kilép a sejtől, és a borban felhalmozódik. Az acetaldehidet tekintik a fino sherry borok érzékszervi tulajdonságait legjobban befolyásoló komponensnek (Moreno et al, 2005). A sherry biológiai érlelése során 300-400 mg/l acetaldehid is keletkezik, azonban leírtak 700-800 mg/l-es koncentrációkat is. Az acetaldehid termelés szintje az etanol fogyasztás szintjét követi, tehát a hártyaképzés során a legnagyobb. Ezután csökken, majd a minimális termelési értéket elérve, ezen érték körül ingadozik. A *S. cerevisiae* var. *montuliensis* és var. *rouxii* változathoz tartozó törzsekre nagyobb mennyiségű acetaldehid termelés jellemző, mint a *S. cerevisiae* var. *beticus* és a var. *cheresiensis* változathoz tartozókra. A 2,3-butándiol és az acetoin koncentrációja az acetaldehid koncentrációval korrelál (Martinez et al., 1998).

A legtöbb aminosav koncentrációja folyamatosan csökken az érlelés során, kivéve a hidroxiprolint és a p-etanolamint. A prolin a legfőbb aminosav a szőlőben; az összes aminosavnak akár több mint 75 %-át is kiteheti (Botella et al., 1990), ezért a prolin fogyasztás az összes aminosav fogyasztást tükrözi. A borélesztők minden aminosavat képesek hasznosítani a fermentáció során, kivéve a prolint. A prolin metabolizmusa mind permeázt, mind prolin oxidázt igényel, amelyek működése oxigénfüggő (Brandriss és Magasanik, 1979). Mivel a fermentáció anaerob körülmények között zajlik, a prolin metabolizmusa pedig a mitokondriumban történik (Ingledew et al., 1987) a folyamat az erjedés folyamán gátolt. A biológiai érlelés során a flor élesztők kizárólag oxidatív metabolizmust folytatnak, így nincs akadálya a prolin hasznosításának (Martinez et al., 1995).

Az aminosavak metabolizmusa során magasabbrendű alkoholok keletkeznek (valin → izobutanol, izoleucin és leucin → izoamil alkoholok), amelyek koncentrációjában a hártya képzéskor (aktívabb metabolizmus) következik be a legjelentősebb változás (Martinez et al., 1998). A hártyaképző élesztők a magasabbrendű alkoholokat is oxidálják, így kisebb mennyiségben ezek aldehidjei is megtalálhatóak a sherry borokban (Magyar, 1998).

2.8.3. A sherry borok színének fejlődése

A biológiai érlelés során a bor színe nem sötétedik, annak ellenére, hogy fahordókban tárolják. A fino borok egyik legjellegzetesebb tulajdonsága a halvány szín.

A szín alakulását a 470 nm-en mért abszorbancia értékkel lehet nyomon követni, amely a bor oxidációjának fokát mutatja. A hártvaképző élesztőkkel beoltott bor abszorbanciája az érlelés során fokozatosan körülbelül a felére csökken, míg a be nem oltott bor abszorbanciája nagyjából a kétszeresére növekedik. A bor abszorbanciában bekövetkezett csökkenés az élesztőhártya kettős hatása következtében kialakult reduktív következménynek köszönhető: egyrészt fizikai gátat jelent az oxigén számára a bor felszínén, másrészt az élesztősejtek felhasználják az oxigént a respirációs metabolizmus során (Martinez et al., 1997a).

A borok színének növekedéséért főleg a polifenolok oxidációja felelős. A polifenolok nem kizárólag a fahordóból vonódnak ki. A kumársav és a kávéssav már a szőlő mustjában is jelen van. A protokatechusav mennyisége azonban jelentős növekedést mutat fahordós érlelés során (kb. háromszoros), ami arra utal, hogy ezen polifenol jelentős része a fából vonódik ki (Martinez et al., 1998).

2.9. *A Saccharomyces cerevisiae* sejtfalának jellegzetességei

2.9.1. A sejtfal szerepe és összetétele

A sejtfal fő funkciója minden kétséget kizáróan az ozmotikus védelem. A sejtfal jelenléte nélkül, ozmotikus stabilizálás hiányában a sejt lizál. A sejt jellegzetes alakját is a sejtfal biztosítja, továbbá a sejtfal permeabilitása nagymértékben befolyásolja a nagy molekulák bejutását és távozását a sejtbe, illetve a sejtől (de Nobel et al., 1990; Stratford, 1994; Klis et al., 2002).

A *S. cerevisiae* esetében a sejtfal a sejt száraz tömegének 15-30 %-át, a térfogatnak pedig a 25-50 %-át teszi ki (Lipke és Ovalle, 1998). Az élesztők sejtfala réteges felépítésű (Klis, 1994).

1. A külső réteg főleg mannoproteinekből (sejtfal kb. 40 %-a) áll. Ez a réteg érzékeny a proteolitikus „támadásra”; hatására a külső réteg teljesen eltűnik, a sejtek alakja azonban változatlanul megmarad, ami arra utal, hogy a külső protein réteg nem járul hozzá közvetlenül a sejtfal mechanikai erősségének kialakításához. Feltételezik, hogy egyes sejtfal fehérjék magának a sejtfalnak a felépítésében játszanak szerepet, valamint a sejtciklus egyes fázisaiban szükségesek a sejtfalban bekövetkező szerkezeti változásoknál, mint pl. a sarjadzás, a mating vagy a spórázás. Más fehérjék az élesztősejt és a környezetük között fellépő interakciókban lehetnek fontosak, mint pl. az agglutináció, a flokkuláció és az adhézio (Roy et al., 1991; Cappellaro et al., 1991; Cappellaro et al., 1994; Roberts és Fink, 1994; Morsa et al., 1999; Guo et al., 2000; Reynolds és Fink, 2001).

2. A belső, β -1,3-glükán réteg (sejtfal kb. 50 %-a) felelős a sejtfal mechanikai stabilitásáért. Maga a glükán is réteges felépítésű, egy belső rostos (fibrilláris) és egy sokkal amorfabb külső rétegből áll. A külső amorf rétegben kis mennyiségben ugyan, de β -1,6-glükán is jelen van (sejtfal kb. 10 %-a), amely fontos szerepet játszik a belső és a külső sejtfal komponensek összekötésében (Kollar et al., 1997). A sejtfal β -1,6-glükánázzal való emésztésével, nemcsak a protein réteg távolítódik el, hanem a belső réteg amorf része is, csak a rostos, plazma membránhoz közel lévő részt hátrahagyva. Ilyen kezelés után a sejt eredeti alakja továbbra is fennáll, azaz maga a rostos legbelső rész felelős a sejtek alakjáért. A glükán továbbá az élesztő killer faktor elsődleges receptora, ezért a glükán szintézishez szükséges gének (*KRE* gének) mutációja toxin rezisztenciát okoz (Lipke és Ovalle, 1998).

A sejtfalban található még kitin (sejtfal kb. 1-3 %-a), amely a *Saccharomyces cerevisiae*-nél elsősorban az anyasejt és a sarjsejt közötti „gyűrűben” és a sarjhegekben (Cabib és Bowers, 1971) található. Maguk a leánysejtek (sarjak) nem tartalmazzak kimutatható mennyiségű kitint (Schekman és Brawley, 1979). A kitin a sejtfalban is megtalálható, a sejtfal belső rétegében, közel a plazma membránhoz glükán-kitin komplexként. A kitin glikozidos kötésekkel kapcsolódik a β -1,3-glükán és a β -1,6-glükán nem-redukáló elágazódásaihoz (Kollar et al., 1995). Annak ellenére, hogy csak kis mennyiségben van jelen a sejtfalban, fontos szerepet tölt be a sejtfal szerkezetében. A kitin szintézist befolyásoló mutációk a sejtek ozmotikus szenzitivitását, abnormális morfológiát, aggregációt okoznak, valamint a szaporodás leállítását megnyúlt sarjakkal. Hasonló lízis/abnormális morfológia figyelhető meg megváltozott kitin eloszlás során is (Stratford, 1994).

A sejtfal összetétele és szerkezete a szaporodás folyamán jelentősen változik, de a sejtfal szintézis és felépítés szigorú kontroll alatt áll. A sejtfal összetételt és felépítést azonban nemcsak a sejtciklus kontrollálja, hanem azt a külső tényezők jelenléte – mint pl. a tápanyag ellátottságtól, pH, hőmérséklet vagy feromonok – is erősen befolyásolja (Klis, 1994).

2.9.2. Sejtfalfehérjék

Az élesztő sejtfalfehérjei erősen glikozilált polipeptidek, gyakran 50-95 %-os szénhidrát (mannán) résszel (van der Vaart et al., 1995). A legtöbb, de nem az összes fehérje O- és N-szénhidrát láncokat tartalmaz. Az O-láncok – amelyek a szerinhez vagy a treoninhoz kapcsolódnak – rövid, egyenes láncok, melyek 1-5 mannózt tartalmaznak α -kötésben. A mannoproteinek O-láncai hozzájárulnak a sejtfal stabilitásához, mivel az O-mannozilációra nem képes proteinek ozmolabilisak (Gentzsch és Tanner, 1996). Az N-láncok – amelyek az aszparaginhez kapcsolódnak – egy 8-15 mannózból álló magból („core”) és számos esetben a maghoz kapcsolódó erősen elágazó külső láncokból állnak

(Klis, 1994). A sejtfelszíni fehérjék szénhidrát oldalláncai számos foszfodiészter hidat tartalmaznak, amely a sejtfelszín negatív töltését biztosítja. A fehérjék oldalláncainak fontos szerepe van a sejtfal hidrofílium-hidrofób tulajdonságának meghatározásában is (Klis et al., 2002).

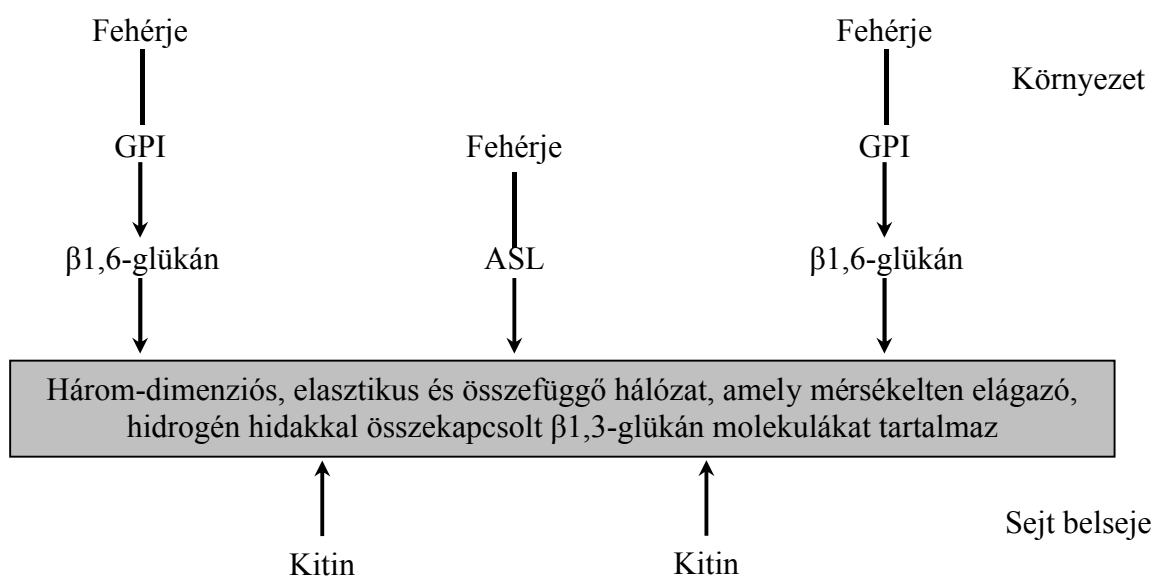
A *Saccharomyces cerevisiae* élesztő sejtfalfehérjéi három csoportba sorolhatóak, amely csoportok a kémiai kötődésben, valamint módjában különböznek. A fehérjék fiziológiai vizsgálata szerint a fehérjék sejtfalhoz való kötődése a sejtfalban betöltött szerepüket tükrözi (Terashima et al, 2003).

2.9.2.1. Nem kovalensen kapcsolódó sejtfal fehérjék

A fehérjék a sejtfal szerkezeti elemeihez kapcsolódnak diszulfid hidakkal vagy egyéb nem-kovalens kötődéssel. A tisztított sejtfalból forró SDS és merkaptotanol (Valentin et al., 1984) vagy ditiotritol (Cappellaro et al., 1998) segítségével kivonhatóak. Összesen 9 ilyen fehérjét mutattak ki (Mrsa et al., 1997), amelyeket a kötődési formájuk alapján Scw1p-Scw9p-nek neveztek el. Az ide tartozó fehérjék vagy enzimek hidrolitikus, részben glikolitikus aktivitással, vagy ezen enzimek homológjai. Egyes fehérjék transzglükózidázként is működhetnek, amivel hozzájárulnak a sejtfal szerkezetéhez és merevségéhez (Mrsa et al., 1999; Mrsa és Tanner 1999).

2.9.2.2. Glükánazzal kivonható kovalensen kapcsolódó sejtfal fehérjék

Számos fehérje kovalensen kötődik a sejtfal szerkezeti poliszacharidjaihoz (4. ábra). Ezen fehérjék egy része különböző glükánokkal kivonhatóak (Valentin et al., 1984; Mrsa et al., 1997).



4. ábra: A *Saccharomyces cerevisiae* sejtfalának szerkezete (Klis et al., 2006)

A fehérjék egymással nagy szerkezeti hasonlóságot mutatnak (van der Vaart et al., 1995). A C-terminális végükön kivétel nélkül tartalmaznak egy GPI-kapocs szignált, amely szükséges a β -1,6-glükánhoz való kovalens kapcsolódáshoz (Lu et al., 1994; Kapteyn et al., 1996; Kollar et al., 1997; Mrsa és Tanner, 1999). Mindemellett, mindegyik gazdag hidroxil aminosavakban, amelyek gyakran a szekvencia bizonyos részein csoportosulnak, valamint jelentősen glikoziláltak (mind N-, mind O-glikoziláció). Kevés ismeret van ezen fehérje csoport fiziológiai szerepéről, kivéve azokat, amelyek olyan sajátos folyamatban vesznek részt, mint pl. az agglutináció vagy a flokkuláció, illetve egyéb sejtfal fehérjék (Shimoi et al., 1998, Kitagaki et al., 1997). Összesen öt fehérjét lehet a sejtfalból glükánáz készítmény segítségével kivonni, amelyeket Ccw1p-Ccw5p-nek nevezték el.

2.9.2.3. NaOH-dal kivonható kovalensen kapcsolódó sejtfal fehérjék

A sejtfalhoz kovalensen kötődő fehérjék egy másik csoportját 30 mM-os NaOH segítségével lehet kivonni. Hat ilyen fehérjét mutattak ki, amelyeket Ccw6p-Ccw11p nevezték el (Mrsa et al., 1997) és a lúg érzékenységük alapján ASL-fehérjeként tartanak számon (de Groot et al., 2005). Ezen fehérjék közé tartozik a Pir-fehérjék családja, amely tagjai egymással nagyfokú homológiát mutatnak. Ezek a fehérjék a Ccw6p, a Ccw7p, a Ccw8p és a Ccw11p. A Ccw11p megegyezik a Ccw5p-tel, tehát glükánázzal is kivonható (Mrsa et al., 1997). Szekvenálással megállapították, hogy a *CCW6* gén megegyezik a *PIR1* génnel, míg a *CCW8* gén a *PIR3* génnel (Toh-e et al., 1993). Southern blot kereszt-hibridizációval kimutattak másik két homológ gént is, a *PIR2*-öt és a *PIR4*-et. A *CCW5* a *PIR4*-nek, a *CCW7* pedig a *PIR2*-nek felel meg. A PIR gén családot először a viszonylag hosszú (18-19 aminosav), sajátos aminosav sorrendet mutató ismétlődő szekvenciák miatt vizsgálták. Az ismétlődő szekvenciák száma 1 (Ccw5p) és 11 (Ccw7p) között változik. A Pir-fehérjék hasonló szerkezettel rendelkeznek, tartalmaznak egy N-terminális szignál peptidet, egy aktív Kex2p proteínáz felismerő helyet, egy ismétlődő szekvenciákból felépülő régiót, valamint egy erősen konzervált C-terminális régiót négy fixált helyzetű ciszteinnel (ún. 4 cisztein domain) (Klis et al., 2002). A Pir-fehérjék jellegzetesen gazdagok hidroxil aminosavakban, amelyek legtöbbje O-glikozilált (Mrsa et al., 1997). A család két tagja (Pir1p és Pir3p) ezen kívül N-glikozilált láncokat is tartalmaz (Russo et al., 1992). A *PIR1* és a *PIR3* közeli rokonságban állnak egymással és a XI. kromoszómán helyezkednek el. A *PIR2* a X. kromoszómán található (Toh-e et al., 1993). Nem ismert a PIR családba tartozó fehérjék pontos funkciója. A *PIR* génekkel homológ géneket találtak a *Kluyveromyces lactis* és a *Zygosaccharomyces rouxii* esetében is, azonban a

Schizosaccharomyces pombe-ben nem, ami azt sugallja, hogy a *PIR* gének a sarjadzó élesztőkben játszanak szerepet (Toh-e et al., 1993). A Pir1p, a Pir2p és a Pir3p a sejtciklus korai G₁-fázisában expresszálódnak, amikor a sejtek izotrópikusan növekednek és a meglévő makromolekula hálózatba új sejtfa komponenseknek kell beépülnie (Kapteyn et al., 1999). Castillo és mtsi. (2003) a Pir4p ismétlődő szekvenciáját tanulmányozva megállapították, hogy a fehérje ismétlődő aminosav szekvenciája nélkülözhetetlen a sejtfaalba való beépüléshez, hiányában a Pir4p csak diszulfid hidakkal kapcsolódik a sejtfaához, nem képes kovalensen kapcsolódni a β 1,3-glükánhoz. Ha az ismétlődés, amely tartalmazza a DGQJO (J valamilyen hidrofób aminosavat jelöl) aminosav szekvenciát, tényleg közvetlen szerepet játszik a β 1,3-glükánhoz való kapcsolódásban, akkor azon Pir-fehérjék, amelyek több ismétlődést tartalmaznak, kettő vagy akár több β 1,3-glükán molekulát is összeköthetnek. Ez jelentősen erősíthetné a sejtfaat (de Groot et al., 2005; Klis et al., 2006). Megfigyelték továbbá, hogy a *PIR* családba tartozó génekben bekövetkező mutáció a generációs idő kismértékű növekedését eredményezi. A mutáns sejtek morfológiája jelentősen különbözik a vad típustól, ugyanis a sejtek térfogata növekedik, sok sejt szabálytalan alakot vesz fel, valamint a sejtek csomókba csapódnak össze (Mrsa és Tanner, 1999).

A *PIR* fehérjék közül a Pir4p kb. 50 %-a kiválasztódik a tápközegbe, míg a Pir2p főleg a tápközegből izolálható vissza, a fehérjének kb. 2-4 %-a marad csak a sejtfaához kötötten (Moukadiri és Zueco, 2001).

2.9.3. Stressztényezők hatása a sejtfa szerkezetére

A borok fermentációja és biológiai érlelése során az élesztők számos stressztényezőnek vannak kitéve, mint pl. oxidatív stressz, megemelkedett hőmérséklet, kis pH, nagy etanol és acetaldehid koncentráció, illetve korlátozott tápanyag és éhezés (Zuzuarregui és del Olmo, 2004).

Az etanol, az acetaldehid és az acetát metabolizmusa a *S. cerevisiae* esetében viszonylag komplex, mivel számos enzim vesz részt benne, valamint a sejt redox egyensúlyától is függ (Aranda és del Olmo, 2003). Az etanolon való növekedéskor a mitokondriális enzimeknek van jelentőségük (Wang et al., 1998; Saigal et al., 1991), ahol is az etanol acetaldehiddé való átalakítását az alkohol dehidrogenáz végzi. A mitokondriális ALD enzimeket az *ALD4* és az *ALD5* gének kódolják, amelyek expressziója erős glükóz represszió alatt áll (Jakobson és Bernofsky, 1974). Mivel a keletkező acetaldehid gyengébben diffundál át a plazma membránon, mint az etanol, jelentős intracelluláris akkumuláció figyelhető meg az élesztőben, amely a külső koncentrációnak akár 10-szeresét is elérheti (Stanley és Pamment, 1992). Az ilyen nagy acetaldehid koncentráció számos metabolikus aktivitást gátol, illetve az exponenciális sejtekben egyes, a stressz válaszáért felelős

gének expresszióját indukálja. Ilyenek a *HSP12*, a *HSP26*, a *HSP82* és a *HSP104* (Carrasco et al., 2001; Aranda et al., 2002), valamint az *ALD* gének (Aranda és del Olmo, 2003).

A különböző stressztényezők a sejtfalra is hatással vannak. Olyan sejtfal-stressz hatására, amely a sejtfal gyengülését okozza, számos GPI-fehérje, valamint az összes Pir-fehérje expressziójának szintje megnő, ami ezen fehérjék sejtfal megerősítésében való részvételére utal (Kapteyn et al., 1999; de Groot et al., 2005).

Természetes környezetben a borélesztőknek kis pH értékeket kell elviselniük. Az kis pH értékekhez történő adaptáció változást okoz a sejtfal összetételben és szerkezetben. Savas pH értékek esetében a Pir2p sokkal nagyobb mennyiségben van jelen a sejtfalban. A nagyobb mennyiség nem a fehérje megnövekedett expressziójának tulajdonítható, hanem a Pir2p-nek a sejtfalba való hatékonyabb beépülésével (Kapteyn et al., 2001; Klis et al., 2002).

2.9.4. Sejtalfehérjék szerepe az adhézióban, az invazív növekedésben és a biofilm képzésben

Az élesztősejtek adhéziója (flokkulációja) speciális sejtfelszíni fehérjék, úgynevezett adhezinek vagy flokkulinok segítségével történik. Az adhéziót két nagy csoportra lehet osztani: a lektin-típusú adhézió (cukor érzékeny) és a cukor érzéketlen adhézió. A *Saccharomyces cerevisiae* lektin-típusú adhéziója esetében az adhezin (a *FLO1*, *FLO5*, *FLO8* és *FLO10* gén termékei) a másik sejt felszínén található cukor-láncokhoz kapcsolódik és a sejtek aggregációját váltja ki. A *S. cerevisiae* sejtek lektin-típusú adhéziója két alcsoportra osztható tovább, a Flo1 és a NewFlo kategóriákra. A Flo1 csoport adhezinjai kizárólag mannózhoz kapcsolódnak, míg a NewFlo csoport adhezinjai a mannóz mellett, glükózhoz illetve glükóz oligomerekhez (pl. a maltóz) is képesek kapcsolódni. A cukor érzéketlen adhézió esetében az adhezin (a *FLO11* gén terméke) a cukrok helyett a peptidekhez kötődik, vagy a sejtfelszín hidrofóbicitásának megnövelésével elősegíti a sejtek és az abiotikus felszín közötti hidrofób kölcsönhatások kialakulását (Kang és Choi, 2005). A *FLO11* gén terméke a flokkuláción kívül az álhifa képzésben, az invazív növekedésben, valamint az agarhoz, illetve egyéb felületekhez való adhézióban is szerepet játszik (Lambrechts et al., 1996; Lo és Dranginis, 1996; Lo és Dranginis, 1998; Guo et al., 2000; Reynolds és Fink, 2001; Bayly et al., 2005). Az élesztősejtek álhifás növekedésre való átváltásának képessége, valamint invazív növekedésük virulencia faktor lehet. Mind az álhifás, mind az invazív növekedés törzsfüggő, de nem mindig kapcsolt jelenség, továbbá az álhifa képzés nem előfeltétele az invazív növekedésnek. Immungyenge betegek hemokultúrájából azonban néhány esetben izoláltak *S. cerevisiae* törzseket, amelyek között péklesztő és probiotikus hatású (var. *boulardii*) törzsek is megtalálhatók voltak

(Llanos *et al.*, 2006) Klingberg és mtsi. (2008) vizsgálatai alapján a klinikai és nem-klinikai (élelmiszer) eredetű *Saccharomyces cerevisiae* izolátumok álhifaképzése és invazív növekedése között nincs szignifikáns különbség. Azonban sem a klinikai, sem a nem-klinikai *S. cerevisiae* törzsek nem okozzák az emberi hámszövetek destabilizálását egészséges immunrendszerű egyéneknél, hatásuk inkább a probiotikus baktériumokéhoz hasonló, azaz egészséges emberi gyomor-bélrendszerre védő hatásuk lehet.

Az adhéziót kódoló gének expressziója nem konstitutív, az aktiválást különböző környezeti tényezők, mint pl. szénhidrát és/vagy nitrogénéhezés, illetve a pH és etanol szint változása válthatja ki, ezáltal az élesztők adhéziós képessége a stresszhez való adaptáció egyik módja lehet. (Verstrepen és Klis, 2006; Sampermans *et al.*, 2005)

A környezeti tényezők változása egyes *Saccharomyces cerevisiae* haploid sejtjeiben adhezív/invazív növekedést indukál (glükóz hiány), míg a diploid sejtek esetében álhifa képzést idéz elő (nitrogén hiány) (Cullen és Sprague, 2000). Ezen morfológiai folyamatok a Flo11p sejtfelszíni jelenlétét igényelik (Braus *et al.*, 2003). A *FLO11* expressziójának hiánya esetén az adhezív/invazív növekedés, illetve álhifa képzés elmaradhat. Ilyenek pl. az S288c genetikai háttérű *S. cerevisiae* törzsek, amelyeknél a *FLO11* nem expresszálódik a szabályozó *FLO8* génben bekövetkezett nonsense mutáció következtében, azonban ezt a tenyésztés körülményei is befolyásolják (Mortensen *et al.*, 2007).

Mint más glükóz hiány által kiváltott folyamat, az adhezív/invazív növekedés is az Snf1 protein kináz jelenlététől függ (Cullen és Sprague, 2000). Az Snf1 a *FLO11* transzkripcióját pozitívan szabályozza, ugyanis gátolja az Nrg1 és az Nrg2 fehérjék negatív, gátló tulajdonságát, így a *FLO11* expressziójának derepresszálsát váltja ki. Továbbá az Snf1 aktivitás növekedése a *FLO11* megnövekedett expresszióját és így az adhezív/invazív tulajdonság javulását eredményezi. Ez azonban nemcsak az adhezív/invazív növekedésre, hanem az álhifa képzésre is igaz (Kuchin *et al.*, 2002). A *FLO11* transzkripcióját a ploiditás is befolyásolja. A ploiditás növekedésével a törzsek adhéziója csökken, pl. a diploid sejtek adhéziója nem olyan jó, mint a haploid sejteké (Reynolds és Fink, 2001). A *FLO11* túl-expresszáltatásával azonban a diploid sejtek invazív képessége javítható (Lo és Dranginis, 1998).

Reynolds és Fink (2001) kimutatták, hogy a laboratóriumi *S. cerevisiae* törzsek esetében a biofilm képzés indukálható, valamint, hogy a folyamathoz a *FLO11* gén szükséges. A borélesztők flor képzése, amely úszó biofilmnek tekinthető, szintén glükóz hiány esetén indukálódik (Cantarelli és Martini, 1969) etanol jelenlétében. A flor, más mikrobiális biofilmekhez képest nem tartalmaz poliszacharid vagy fehérje mátrixot, hanem kizárólag úszó élesztőrétegből áll. A flor törzsek

esetében a *FLO11* expressziójának mértékét a különböző szénforrások (glükóz vagy etanol) nem befolyásolják, azonban a sejtfelszín hidrofóbicitása jelentős mértékben eltér. Az etanol jelenléte a szaporodás során a sejtfelszínen lévő Flo11p konformációjában okoz változást, ami a hidrofóbicitás növekedését eredményezi, továbbá egyéb hidrofób képletek, mint pl. zsírsavak kapcsolódhatnak a Flo11p-ben található szerinhez és treoninhoz (a Flo11p 50 %-a szerin és treonin), ami a sejtfelszínnek hidrofób tulajdonságot kölcsönöz (Ishigami et al., 2006). Mindemellett a *FLO11* deléciónja nem akadályozza meg a flor képzést, ez azt jelzi, hogy egyéb faktorok is szerepet játszhatnak (Fidalgo et al., 2006). Ishigami és mtsi. (2006) a *FLO11* génnel homológ gént mutatottak ki PCR segítségével, amely hozzájárult a sejtek hidrofóbicitásának növeléséhez és a flor képzéshez.

2.10. Az élesztősejtek hidrofób tulajdonságai

A mikrobasejtek sejtfelszíni tulajdonságai – mint pl. a sejtfelszíni hidrofóbicitás – számos jelenségben (aggregáció, flotáció és adhézió) részt vesznek, amelyek fontos szerepet játszanak a biotechnológiában (söripar, immobilizált sejteket alkalmazó reaktorok), a folyamattervezésben, az anyag technológiában (eldugulás), az orvostudományban (implantátumok biokompatibilitása, foglepedék) és a természetvédelemben (vízkezelés, bioremediáció) (Dengis és Rouxhet, 1997).

A hidrofób sejtfelszíni komponensek szerepét a szilárd felszínen való biofilm képzés esetében is megfigyelték, ahol a sejtfelszín hidrofób jellege szerepet játszik az élesztősejtek mátrixhoz, valamint a már kapcsolódott sejtekhez való kapcsolódásban (Verstrepen és Klis, 2006). Azonban míg a szilárd felszínen kialakuló biofilm képződésnél a sejtek egy exopoliszacharid mátrixba vannak ágyazódva, a folyadék felületén történő hártvaképzés során sem külső, sem belső specifikus képződményeket nem találtak. A borászatban a sejtfelszín hidrofóbicitása fontos szerepet játszik a sejtek CO₂-hoz való adhéziójában, ez a folyamat nagymértékben hasonlít a flokkulációhoz, amely egy fehérje (lektin) sejtfelszíni szekrécióját igényli (Stratford, 1989; Calleja, 1994; Iserentant, 1996).

A sejtfelszíni hidrofóbicitást azonban nemcsak sejtfelszíni fehérjék okozhatják. Egyes szerzők szerint a hidrofóbicitás nagymértékben függ a sejtfelszínen jelenlévő zsírsavaktól, ami szénforrásokkal befolyásolható, ugyanis Iimura és mtsi. (1980b) kimutatták, hogy 0,5 N nátrium-hidroxiddal való kezelés, amely a sejtfelszínen lévő zsírsavakat távolítja el (főleg palmitoleinsav és oleinsav) erős hidrofóbicitás csökkenést eredményez.

Más szerzők szerint a hidrofóbicitás növekedése a sejten belüli lipid komponensek koncentrációjának növekedésével is magyarázható lehet (Fleet, 1991), emellett a lipid részecskék mennyiségének növekedése hozzájárulhat a sejtek sűrűségének csökkenéséhez, ezáltal elősegítve a sejtek folyadék felszínre való felemelkedését. Továbbá, a szterolok mennyisége és a foszfolipidek telítetlen zsírsav összetétele fontos szerepet tölt be a plazmamembrán tulajdonságaiban, mivel a membrán fluiditásában játszanak szerepet és befolyásolják a membrán-kapcsolt enzimek aktivitását (Alexandre et al., 1994). A plazmamembrán működése közvetlenül összefügg a sejt életképességével (Rozes et al., 1988; Mauricio et al., 1991), valamint az alkohol toleranciával (Mishra és Prasad, 1989; Castillo, 1992). Ez összefüggésben lehet a membránok aerob körülmények között megnövekedett integritásával és működésével.

2.10.1. Élesztősejtekben előforduló lipidszemcsék

Számos eukarióta sejtben – növényi sejt, emlős sejt, és egysejtű organizmusok, mint az élesztő (Clausen et al., 1974; Schaffner és Matile, 1981) – kimutattak intracelluláris lipid cseppeket. Az emlősök lipid szemcsék szerkezete viszonylag egyszerű. Erősen hidrofób, neutrális lipideket (trigliceridek és/vagy szteril-észterek) tartalmazó magból, és polárisabb komponenseket tartalmazó felszíni rétegből állnak.

Clausen és mtsi. (1974), valamint Schaffner és Matile (1981) az élesztő lipid szemcsék biokémiai összetételét tanulmányozva megállapították, hogy a lipid cseppek itt is főleg trigliceridekből és szteril-észterekből állnak (kb. 50 % mindegyik), valamint kis részben foszfolipidekből. Ezeket az eredményeket Zinser és mtsi. (1993) is megerősítették. Feltételezik, hogy a lipid részecskék trigliceridjei és szteril-észterei a membrán felépítéséhez szükséges komponensek raktározására szolgálnak. Daum és Paltauf (1980) kimutatták, hogy zsírsav hiány esetén a szteril-észterek és trigliceridek zsírsavjai mobilizálhatóak, valamint a *Saccharomyces cerevisiae* élesztők szteril-észterei és szabad szteroljai egymásba átalakíthatóak a metabolizmus során, a szaporodási fázisától függően. Az aktív szaporodás folyamán ugyanis a szteril-észterek hidrolizálódhatnak és a szabad szterolok újrahasznosulhatnak a membrán szintézisben (Lewis et al., 1987).

A lipid részecskéknek jellegzetesen gömbszerű szerkezetük van, csak néhány esetben figyeltek meg kisebb deformációt. A cseppek többségének az átlagos átmérője 0,3-0,5 μm , habár nagyobb, 1,2-1,6 μm -es méret is előfordulhat. A lipid cseppeket egyrétegű foszfolipid molekularéteg veszi körül, a részecskék fehérje mennyisége azonban elhanyagolható. Ezek a fehérjék főleg a cseppek felszínén helyezkednek el, és egyéb sejtmembránokkal való kapcsolatok kialakításában vesznek részt. A lipid

részecskék és a vakuoláris membrán erősen összeragadhat, ami megnehezíti a lipidek izolálását. A részecskék foszfolipid összetétele eltér az élesztő membránokban található foszfolipidekétől, ami főleg a nagy foszfatidil-inozitol tartalomnak tulajdonítható. Az élesztőkben található lipid cseppek általános összetételét az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat: A lipid részecskék általános lipid összetétele (A) és ezen belül a foszfolipidek összetétele (B)(Leber et al., 1994)

A/		B/	
A lipid részecskék összetétele	tömeg %-a	A lipid részecskék foszfolipidjeinek összetétele	összes foszfolipidre eső %
Trigliceridek	51,2	Foszfátidil-kolin	36,4
Szteril-észterek	44,4	Foszfátidil-inozitol	31,6
Protein	2,6	Foszfátidil-etanolamin	20
Foszfolipidek	1,3	Foszfátidil-szerin	5,4
Szkvalének	0,5	Dimetilfoszfátidil-etanolamin	3,9
Szterolok	<0,3	Foszfátidsav	2,7

Valero és mtsi. (2002) széleskörűen vizsgálták a fermentáció és hátyaképzés során bekövetkező változásokat az élesztősejtek lipid összetételében és tartalmában.

1. Az alkoholos fermentáció során az élesztők foszfolipid tartalma csökken. A fermentáció lejátszódása után a foszfolipid tartalom tovább csökken, mind a hátyaképzés, mind pedig a hátyaképzés gátlása esetén, azonban ez a csökkenés a hátyát képző élesztők esetén kisebb, ezért nagyobb foszfolipid tartalommal rendelkeznek.
2. Az élesztők domináns zsírsavai a palmitinsav (C16), a palmitoleinsav (C16:1), a sztearinsav (C18) és az oleinsav (C18:1). A fermentáció folyamán a 16 szén-atomszámú zsírsavak mennyisége csökken, míg a 18 szén-atomszámúaké nő. Az erjesztés után történő érlelés során az oleinsav mennyisége nagymértékben növekedik, az összes zsírsavnak akár a 60 %-át is kiteheti. Hátyaképzés gátlása esetén a zsírsavak százalékos aránya nem változik szignifikánsan, azonban nagy mennyiségű zsírsav akkumulálódik. Ez feltehetően annak tulajdonítható, hogy a sejtek szaporodása leáll, a zsírsavak bioszintézise azonban bizonyos ideig még folytatódik. A fermentáció alatt az élesztők telítetlenségi indexe kb. 0,5. Ez megfelel az élesztők optimális értékének. Hátyaképzés során az index kismértékű növekedést mutat, akár a 0,7-es értéket is elérheti.

A 18 szén-atomú zsírsavak mennyiségében bekövetkező növekedés azt jelzi, hogy a fermentáció befejezésével az élesztők egy adaptációs fázisba lépnek, melynek során az oleinsav aránya nő

más zsírsavak rovására. Ezért a hártaképzésre való átváltás a zsírsavak telítetlenségi indexének növekedését okozza (főleg a C18:1/C18 arány nő) (Farris et al., 1993). Ez befolyásolja az élesztő etanol toleranciájának növekedését, talán a hidrofób jellegét, valamint a sűrűség csökkenését. Eredményképpen a sejtek felemelkednek a bor felszínére.

3. Szterolok közül az élesztőkben a szkvalén és az ergoszterin a legjelentősebb. Hártaképzéskor az ergoszterin mennyiségében csökkenést lehet megfigyelni, ami valószínűleg a lassú szintézisnek tulajdonítható. A hártaképzés gátlása esetén azonban mind a szkvalén, mind pedig bizonyos szterin intermedierek és az ergoszterin akkumulálódik a szaporodás gátlása miatt.

Az ergoszterin/foszfolipid arány a fermentáció során végig alacsony, ami a foszfolipid akkumulációnak (főleg telített zsírsavak) köszönhető. A hártaképzés során ez az arány stabil maradt. Van der Rest és mtsi. (1995) szerint az optimális sejtaktivitás szempontjából <1 ergoszterin/foszfolipid arány a kívánatos. A hártaképzés gátlása esetén ez az arány nagymértékben növekedik (>1), ami a foszfolipid tartalom csökkenésének és az ergoszterin akkumulációnak köszönhető, ez pedig az életképesség csökkenését eredményezi.

2.10.2. Oxidált zsírsavak (oxilipinek) a sejt felszínen

Az oxilipinek oxidált telített és telítetlen zsírsavak, amelyek széles körben megtalálhatóak a természetben – pl. növényekben, állatokban és egyes mikroorganizmusokban – mint a különböző komplex lipidek és szabad karboxilsavak összetevői (Kock et al., 2003). Nagyszámú telítetlen hidroxil zsírsavakat találtak gombákban, amelyek a lipoxigenáz, a dioxigenáz vagy a citokróm P-450-közvetített útvonalakon keletkeznek. A gomba oxilipinek többsége oleinsavból vagy linoleinsavból keletkezik, de vannak példák arachidonsav-származék (AA-származék) oxilipinekre is (Bhatt et al., 1998). Ezen komponensek jelenlétéről először Stodola és mtsi. (1967) tudósítottak a *Rhodotorula graminis* és a *Rhodotorula glutinis* törzsek extracelluláris glikolipidjében.

Az oxilipinek erős biológiai aktivitással rendelkeznek, és fontos szerepet töltenek be a sejt működésében (van Dyk et al., 1994). Az oxilipineknek fontos szerepük van az askospórák kiszabadulásában, valamint az askuszból való kiszabadulás után az askospórák aggregációjában (Kock et al., 1999). Kock és mtsi. (2004) az *Eremothecium ashbyi* askospóráinak nano-méretű uszonyszerű képződményein, valamint a *Dipodascopsis uninucleata* spóráinak horogszerű képletein mutatták ki a 3-hidroxil oxilipinekkel való borítottságot. Az *Eremothecium sinicaudum* askospóráin szintén találhatóak oxilipinekkel borított nano-méretű felszíni képződmények. A hagyományos askospóra festés szerint ezek a részek hidrofóbok (Baretseng et al., 2004). Ettől

eltérően az *Eremothecium coryli* aszkospóráinak a teljes felszínét 3-hidroxi oxilipin borítja (Leeuw et al., 2005).

A 3-hidroxi oxilipinnel borított felszíni képződmények keletkezése azonban nem korlátozódik az aszkospórákra. Oxilipinek, mint pl. a prosztaglandinok jelenlétéről tudósítottak a patogén *Candida albicans* élesztőben is (Harris et al., 2002). Az aszpirin már több mint egy évszázada ismert NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drug), jelentős antifungális aktivitással. Alem és Douglas (2004) kimutatták, hogy az aszpirin a *Candida* biofilm képződését 95 %-ig gátolta az oxilipin termelés gátlása révén. Az aszpirin jelenléte az élesztősejtek adhézións periódusában csak minimális hatással rendelkezett a biofilm kialakulására, viszont az érett biofilmre jelentős hatással rendelkezett, már a gyógyszer fiziológiás koncentrációja (75-200 μ M) is 20-80 %-kal csökkentette a biofilm aktivitását. A planktonikus sejtek életképességét drasztikusan csökkentette (1 %-ra), de az általában ellenálló a szilárd felületen kialakuló biofilmben található sejtek életképességét is jelentősen redukálta (1,9 %). Mindenesetre az aszpirin biofilm gátló hatása nem egyedül az antifungális hatásnak köszönhető.

A *Saccharomyces cerevisiae* egyes törzsei (köztük a fermentációs eljárásokban alkalmazottak is) rövid szénláncú (főleg 8 szénatomos) oxilipineket termelnek. A nem-ivarosan flokkuláló *Saccharomyces cerevisiae* szintén tartalmaz 3-OH 8:0 és 3-OH 10:0 oxilipineket a sejtfelszínen, amelyek kapcsolatba hozhatóak bizonyos „ragados” képződményekkel, amelyek szerepet játszanak a flokkulációban. Ha acetilszalicilsavat (aszpirint) adagoltak a *S. cerevisiae* tenyészetéhez, nemcsak a flokkuláció gátlódott szignifikánsan, hanem a 3-hidroxi 8:0 termelése is. Ezen eredmények egyértelmű összefüggést mutatnak a 3-OH 8:0 oxilipinek jelenléte és a sejtek flokkulációja között (Strauss et al., 2005). Kock és mtsi. (2000) a flokkulens élesztőben az oxilipin eloszlást 3-hidroxi oxilipin-specifikus antitestekkel vizsgálták. A vizsgálat szerint az oxilipinek a növekedés korai fázisától kezdve folyamatosan szintetizálódnak, és a sejtfallal vannak kapcsolatban. Az idősebb sejtben egy ozmofil réteg jelenik meg a sejtfallal erősen társulva és kismértékben átfedve. A flokkuláció kezdetekor ez a réteg elkülönül, míg kitüremkedések keletkeznek, amelyek a sejtfalon keresztülhatolnak. Érdekesség, hogy az ozmofil réteg „szellemszerűen” hatol át a sejtfalon, látható sejtfal szerkezet változás nélkül. Hasonló kitüremkedések figyelhetők meg egyes „érett” flokkulens sejtek felszínén, valamint a flokkuláló sejtek között is. Az oxilipinek mennyiségének növekedése egybeesett a Straver és mtsi. (1993) által megfigyelt sejtfelszíni hidrofóbicitás növekedéssel a flokkuláció során. További vizsgálatok kimutatták, hogy a sejtfalhoz kapcsolódó oxilipinek nemcsak a flokkulens *Saccharomyces cerevisiae* sejtekben, hanem más *S. cerevisiae* törzsekben is jelen vannak (Kock et al., 2000).

2.10.3. A sejtfelszíni hidrofóbicitás és mérésének lehetőségei

Az irodalomban számos módszer található a hidrofóbicitás meghatározására. Azonban egyik módszer sem kizárólagosan a sejtfelszín hidrofóbicitását írja le, ugyanis az alkalmazott kísérleti paraméterek is nagymértékben befolyásolják a megfigyelt hidrofób kölcsönhatást, valamint egyéb nem hidrofób hatások is zavarhatnak (Rosenberg et al., 1980).

Általánosságban azonban elmondható, hogy a hidrofil sejtek hidrofil, míg hidrofób sejtek a hidrofób szubsztrátumokhoz kötődnek jobban. Ha azonban a szubsztrátum és a sejtfelszín töltése azonos, akkor a taszító elektrosztatikus kölcsönhatások hátrányosan befolyásolják a kötődést.

Széleskörűen tanulmányozták a flokkuláló sejtek hidrofóbicitását. A flokkuláció sejtfelszíni fehérjék által létrehozott aggregáció. A *S. cerevisiae*-nél háromféle flokkulens típust írtak le, figyelembe véve a cukrok által okozott reverzibilis gátlást (Stratford és Assinder, 1991; Masy et al., 1992). A különböző flokkulens sejtek mind hidrofóboknak bizonyultak, csak a hidrofóbicitás mértékében különböztek. A flokkuláció azonban megfigyelhető volt CSH hiányában is (Suzzi et al., 1994). A flokkuláció erősen függött a flokkulációs puffer pH értékétől, a hidrofóbicitást a méréshez használt puffer pH értéke azonban nem befolyásolja szignifikánsan (pH 2-10 intervallumban) (Smit et al., 1992). Annak ellenére, hogy flokkuláció egyes szénhidrátok jelenlétére érzékeny, a monoszacharidok (1000mM-os koncentrációig) nem befolyásolják a sejtfelszín hidrofóbicitását, illetve EDTA (25 mM) adagolása sem (amely szintén gátolja a flokkulációt a Ca^{2+} megkötése által). A flokkulens élesztősejtek proteolitikus enzimekkel való kezelése azonban erős csökkenést eredményezett a hidrofóbicitásban (Suzzi et al., 1994). Az enzimekkel való kezelés a flokkulációs képességet is megszünteti, igaz nem minden esetben (Smit et al., 1992). Ez azt a feltevést igazolja, hogy a hidrofóbicitást ugyan a sejtfelszínen lévő fehérje természetű anyagok okozzák, azonban ezek valószínűleg különböznek a sejt-sejt kapcsolatot kialakító fehérjéktől. Szaporodás során az flokkulens sejtek hidrofóbicitása az exponenciális fázis végénél gyorsan növekedik. Ez az emelkedés a hidrofóbicitásban röviddel megelőzi azt a pillanatot, amikor a sejtek szaporodása leáll és flokkulensé válnak (Smit et al., 1992)

Számos, a természetben előforduló mikroorganizmus képes a fermentációs médium levegő-víz határfelületen habot vagy filmet képezni. A habzást okozó élesztők sejtfelszíne erősen hidrofób. A habzást okozó élesztők azonban egyes szempontból eltérően viselkednek a flokkuláló élesztőktől, ugyanis pl. a habzást okozó élesztők esetében az EDTA a hidrofóbicitást erősen csökkenti, valamint proteázzal való kezelés nemcsak megszünteti a hidrofóbicitást, de a sejtek minden esetben elvesztik habzási képességüket is. A habzást okozó élesztők esetében a szaporodás során a hidrofóbicitás

mértéke nem emelkedik, hanem pont ellenkezőleg, kismértékű csökkenést mutat (Romano et al., 1994).

A flor élesztők sejtfelszínének hidrofóbicitását Imura és mtsi. (1980b) tanulmányozták kiterjedten. Az etanol a hidrofóbicitás jelentős növekedését eredményezi. Minél nagyobb az etanol koncentráció, annál nagyobb a CSH. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az etanol kedvez a hártaképzésnek a CSH emelése által, bár a hidrofóbicitást a sejtek kora is befolyásolja. A stationer sejtek hidrofóbicitása nagyobb, mint a logaritmikus fázisban lévő sejteké. Érdekesség, hogy etanolt tartalmazó környezetben a sejtek nem mutatják ezt a különbséget. A pH emelésével a hártaképzés csökken és a hidrofóbicitás mértéke csökken, míg a lesüllyedő sejtek mennyisége nő. A nagy hidrofób érték szükségesnek tűnik a film-képzéshez, habár a CSH nem az egyedüli meghatározó a film-képzésnél, ugyanis kimutatták, hogy a légzésdeficiens mutánsok, amelyek nem képesek hártát képezni, megtartják a magas CSH értéket (Alexandre et al., 1998).

A hidrofóbicitás leírására legelterjedtebben a szénhidrogénekhez való adhézió mérését alkalmazzák. Az adhézió esetében, ugyanúgy, mint az aggregáció során bonyolult van der Waals erők, elektrosztatikus kölcsönhatások, valamint a sejtfelszín struktúrája is befolyásolhatja a hidrofóbicitás mértékét (pl. a hexadekan cseppek vizes szuszpenzióban erősen negatív töltésűek). Így a MATH módszer nemcsak a sejtfelszín hidrofób jellegét jellemzi, hanem részben a sejtfelszín töltési tulajdonságait is. A sejtek különböző pH értékű pufferben való szuszpendálásával meg lehet változtatni a sejtfelszíni csoportok protonálódásának mértékét, amivel befolyásolható a sejtfelszínen lévő elektrosztatikus kölcsönhatások nagysága (van der Mei et al., 1993).

Az elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatások mellett a Lewis sav-bázis kölcsönhatások szerepe is jelentős. A sav-bázis tulajdonság meghatározható a „contact angle” módszerrel, van Oss és mtsi. (1988) által kifejlesztett egyenlet alapján, viszont bonyolult berendezést igényel. Ezért kidolgoztak a MATH módszeren alapuló egyszerű, gyors és kvantitatív MATS módszert. A MATS módszer lehetővé teszi a mikrobák elektron donor/elektron akceptor (sav-bázis) tulajdonságainak a meghatározását és lehetőséget nyújt a vizes rendszerben lévő szilárd felületekhez való adhézió becslésére. A módszer a mikroba sejt monopoláris és apoláris oldószerekhez való affinitás összehasonlításán alapul. A monopoláris oldószer lehet savas (elektron akceptor) vagy bázikus (elektron donor), de mindkét oldószernek azonos Lifshitz-van der Waals felületi tenzióval kell rendelkeznie.

A MATS mérés esetén nagy elektrolit koncentrációkat alkalmaznak (pl. 0,1M KNO₃ vagy 0,15M NaCl), hogy a sejttöltés maszkírozásával elkerüljék a töltés zavaró hatását (Briandet et al., 1999; Mercier-Bonin et al., 2004).

A MATS mérés során egyedül az apoláris oldószerhez (hexadekánhoz, dekánhoz) való adhézio jellemzi a sejtfelszíni hidrofóbicitást vagy hidrofilitást, mivel a nagy elektrolit koncentráció miatt nincsenek elektrosztatikus kölcsönhatások. A további MATS értékek (monopoláris oldószer) a mikrobacejtek elektron donor (bázikus), illetve elektron akceptor (savas) tulajdonságáról adnak információt. Továbbá az oldószer azonos felületi tenziójának köszönhetően az oldószerpárok esetében kapott eredmények közötti különbségek a mikroba sejtfelületeken jelenlévő Lewis sav-bázis kölcsönhatásokra utalnak (Bellon-Fontaine et al., 1996; Pelletier et al., 1997).

A legtöbb mikroba sejtfelszíne elektron-donor, csak néha lehet elektron-akceptor sejtfelszínt találni. Az uralkodó jellegű elektron-donor karakter következményeként szinte minden mikroba sejtfelszín képes részt venni sav-bázis kölcsönhatásokban. A sejtfelszín sav-bázis tulajdonságának különbségei képezik az eltéréseket a törzsek sejtfelszíni hidrofóbicitásában (van der Mei et al., 1998).

2.11. Borélesztők identifikálása és tipizálása molekuláris módszerekkel

A molekuláris módszereknek egyre nagyobb jelentőségük van az élesztők azonosításában és karakterizálásában a hagyományos, fenotípusos tulajdonságokon alapuló módszerekhez képest. A molekuláris módszerek a DNS polimorfizmusán alapulnak és faj, illetve törzs szintű elkülönítést tesznek lehetővé az iparban is gyakran alkalmazott mikroorganizmusok között.

2.11.1. Kariotipizálás

A pulzáló gélelektroforézissel meghatározható kromoszóma számot és méretet széles körben alkalmazzák a borászati törzsek azonosítására (Bidenne et al., 1992; Martinez et al., 1995). Az ipari törzsek sokszor nagymértékű kromoszóma hosszúság polimorfizmust mutatnak. A borélesztők is változatos elektroforetikus kariotípussal rendelkeznek (Yamamoto et al., 1991; Vezinhet et al., 1990).

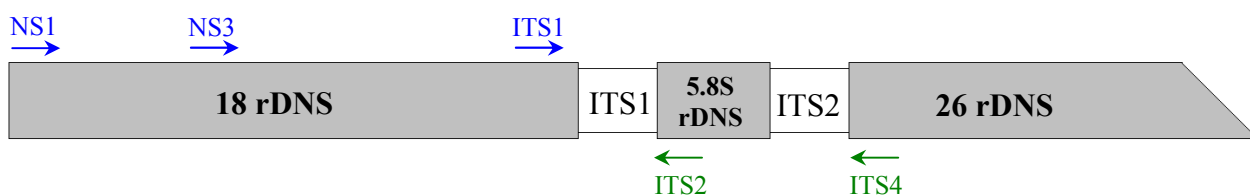
A kariotípus a flor élesztők esetében kevésbé polimorf (Esteve-Zarzoso et al., 2004). A flor *S. cerevisiae* élesztők specifikus mintázatot mutatnak kis eltérésekkel (extra kromoszómák, vagy kisebb méretbeli különbségek). A kismértékű eltérések és a fiziológiai változatok között nem lehet összefüggést kimutatni. Szinte az összes flor élesztő esetében a X., az V., a VIII., a III., a VI. és az I. kromoszóma kisebb, míg a XI. nagyobb a laboratóriumi törzsekhez képest. Ezt a mintázatot „flor

standard”-nak nevezték el (Martinez et al., 1995). Az elektroforetikus kariotípus jó módszernek tűnik a flor törzsek elkülönítésére, azonban a módszer drága és időigényes (Maráz et al., 1999).

A borélesztők és a flor élesztők között a CLP-ben tapasztalt eltérés a borkészítés során fellépő, eltérő szelekciós nyomásnak tulajdonítható – mint pl. a nagyobb etanol tartalom (15 %) és az oxidatív metabolizmus. Számos tudósítás beszámol az etanol és az acetaldehid mutagén hatásáról az élesztő kromoszómális DNS-re (Ristow et al., 1995). Az etanol másodlagos hatásaként kromoszómavesztés léphet fel az etanol membrán oldó tulajdonsága miatt. Ez magyarázat lehet a borélesztők esetében nagy gyakorisággal tapasztalt aneuploidianak (Martinez et al., 1995; Guijo et al., 1997).

2.11.2. A riboszómális-DNS szekvencia analízisen alapuló módszerek

A mikroorganizmusok azonosítására elterjedten alkalmazzák a génspecifikus szekvenciák PCR-rel történő amplifikálását. A riboszómális RNS megbízható filogenetikai marker; minden sejtben jelen van, mindenhol ugyanazt a funkciót látják el és a nukleotid szekvenciájuk erősen konzervált. A gombákra jellemző rDNS (**5. ábra**) erősen konzervált régióinak (5.8S, 18S és 26S) analízisével hatékonyan elkülöníthetők a távolabbi kapcsolatban lévő taxonok, míg a nagyobb különbségeket mutató régiók (nemkódoló ITS és IGS régiók) lehetővé teszik a genotipikailag közelebbi rokonságban álló fajok elkülönítését (Kurtzman és Robnett, 1991). A riboszómális gének RFLP mintázatán alapuló módszer hasznosnak bizonyult a *Saccharomyces sensu stricto* fajok elkülönítésében is (Valente et al., 1996; Fernandez-Espinar et al., 2000).



5. ábra: A gomba rDNS szerkezete és a gyakran alkalmazott primerek kötődési helyei (Sogin, 1990)

Az élesztők 5.8-ITS régiója (5.8S riboszómális DNS, valamint az ITS1 és ITS2 szakaszok) nagyobb interspecifikus különbségeket mutat (Esteve-Zarzoso et al., 1999), mint a 18S és 26S rDNS (Kurtzman, 1992, 1993; Kurtzman és Robnett, 1998), amely így közeli rokonságban álló fajokat is elkülönít.

A flor élesztők 5.8-ITS régióinak restrikciós mintázata eltér a *S. cerevisiae* tipikus mintázatától. Szekvencia elemzés alapján a különbség az ITS1 régióban a 131-es és a 154-es nukleotidok között jelenlévő 24 bp-os delécióknak tulajdonítható (Fernandez-Espinar et al., 2000). Ezt a különbséget Esteve-Zarzoso és mtsi. (2001, 2004) is leírták a sherry borok biológiai érlelése alatti populáció dinamikát tanulmányozva. A deléció a flor *S. cerevisiae* mind a négy változatában (*beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* és *rouxii*) jelen volt (Esteve-Zarzoso et al., 2004).

A *Saccharomyces cerevisiae* ITS1 régiójának másodlagos szerkezeti modellje alapján a flor élesztőkben a deléciós ITS1 régió nem felel meg a stabil hajtúkanyar szerkezetnek (Yeh és Lee, 1991). Azonban a határoló direkt 8 nukleotidos ismétlődések (egy a deléciós régió belül, egy pedig azon kívül) azt sugallják, hogy a 24 bp-os deléció a replikáció során fellépő szálcsúszást követő hibás bázispárosodás vagy egy crossing-over eredményeképpen keletkezhetett.

2.11.3. Mitokondriális-DNS analízis

A hártvaképző élesztőknél különösen lényeges a mitokondrium, ugyanis rendelkezniük kell az összes, oxidatív metabolizmushoz szükséges enzim rendszerrel, amely megkülönbözteti ezen élesztőket a fermentációt lebonyolító élesztőktől (Mesa et al., 1999).

A mitokondriális DNS restrikciós analízise gyors és egyszerű módszer a *Saccharomyces* élesztők jellemzésére, amellyel a bor fermentációja nyomon követhető (Ibeas és Jimenez, 1997c).

A *S. cerevisiae* flor élesztőkre nagyfokú mtDNS polimorfizmus jellemző (Martinez et al., 1995; Mesa et al., 2000; Esteve-Zarzoso et al., 2001). A polimorfizmus a restrikciós fragmentumok számában és méretében is jelen van (Martinez et al., 1995), az egyes flor *S. cerevisiae* változatok esetében azonban nem lehet specifikus mintázatot megállapítani (Fernandez-Espinar et al., 2000).

A nagymértékű mtDNS polimorfizmus feltételezhetően a nagy etanol tartalmú környezet mutagén hatásának tulajdonítható, ugyanis a mitokondriális genom felelős a nagy etanol koncentrációk esetében a túlélésért (Jimenez és Benitez, 1988). Mivel a sherry borokban a flor élesztők oxidatív metabolizmust folytatnak, feltételezték, hogy az etanol jelentős mtDNS mutációt okoz (Martinez et al., 1995). Ibeas és Jimenez (1997c) arról tudósítottak, hogy a flor élesztőkben az etanol mutagenitásának a mechanizmusa inkább a mtDNS elvesztése, mintsem a mtDNS szekvenciájában bekövetkező változás, ugyanis az etanol hatására indukálódott petite mutánsok esetében a mtDNS teljes hiánya volt megfigyelhető. Ezt a feltevést alátámasztja, hogy az etanol egy aktív membrán-dezorganizáló oldószer.

Ristow és mtsi. (1995) már korábban kimutatták, hogy az etanol a mutagén hatását a metabolitján, az acetaldehiden keresztül fejti ki. Az acetaldehid erősebb mutagén hatással rendelkezik, mint az etanol. A mtDNS szekvencia változása az acetaldehid és az etanol indirekt hatása lehet, amely a DNS-ben töréseket okoz, mind nukleáris, mind mitokondriális szinten. A DNS javítása során, a mtDNS polimeráz – amelyik nem rendelkezik javító („proof-reading”) képességgel – változásokat hagy a DNS-en, amit az RFLP mintázat kimutat, a nukleáris DNS azonban teljesen kijavítódik. Így a mitokondriális genom sokkal nagyobb mutációs gyakoriságot mutat, mint a kromoszómális gének (Castrejón et al., 2002).

2.11.4. Molekuláris tipizálás

Az élesztők faji azonosítása mellett egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek az eltérő törzsek meghatározására is. Nem minden *S. cerevisiae* törzs alkalmas például a fermentációs folyamat irányításához, továbbá a különböző törzsek eltérő illat- és aromaanyagokat termelhetnek, ami hozzájárul a bor végső érzékszervi tulajdonságaihoz (Henschke, 1997).

A RAPD analízist széles körben alkalmazzák a mikrobiális törzsek faj szinten belüli karakterizálásához a különböző biodiverzitási, ökológiai és epidemiológiai tanulmányokban. A Williams és mtsi. (1990) által kifejlesztett módszerrel tetszőleges DNS szakaszok amplifikálhatóak véletlenszerűen, egyetlen rövid primer felhasználásával, amelynek eredményeképpen specifikus mintázatot adó PCR termékek keletkeznek. A módszer egy olyan egyszerű és költségtakarékos molekuláris módszer, amely a törzsek közötti szekvencia különbségeket kimutatja. A RAPD a kódoló és a nem-kódoló régiókat egyaránt felszaporítja random módon, aminek eredményeként a megjelenő PCR termékek eredete lehet mind a lassan mutálódó, feltételezhetően szelektív nyomás alatt álló konzervált gének, mind a gyorsabban változó nem-kódoló, genetikai sodródásnak kitett szekvenciák (Corte et al., 2005). A RAPD az amplikonok olyan kombinációját eredményezi, ami lehetővé teszi a fajon belüli törzsek, mint például a *S. cerevisiae* törzsei elkülönítését (Baleiras Couto et al., 1996; van der Westhuizen et al., 1999; Andrighetto et al., 2000).

A mikroszatellitek (SSR) rövid, általában 10 bp-nál rövidebb DNS motívumokat tartalmaznak közvetlen tandem ismétlődésekben. Ezek az ismétlődő szekvenciák a magasabbrendű élőlények DNS-ének olyan fő komponensei, amelyek hossza hipervariábilis a DNS replikáció során fellépő hibák (szálcúszás) miatt (Gonzalez Techera et al., 2001). Field és Wills (1998) többek között a

S. cerevisiae genomját vizsgálták tandem ismétlődések után kutatva és javasolták a háromnukleotidos ismétlődések élesztők genotipizálására való alkalmazását. Howel és mtsi. (2004) sikeresen alkalmazták a módszert a borerjedés során a populáció dinamika tanulmányozására. A mikroszatellit PCR reprodukálhatósága jobb, mint a RAPD-PCR esetében, ugyanis a specifikus primerek alkalmazása nagyobb annealing hőmérsékletet tesz lehetővé, sőt az SSR eredménye allél hosszként is kifejezhető (Gonzalez Techera et al., 2001).

A kutatások során olyan génekre terelődött a figyelem, amelyek ún. miniszatellit-szerű szekvenciákkal rendelkeznek. A miniszatellitek 10-100 bp hosszúságú motívumokat tartalmaznak tandem ismétlődésekben, amelyek rekombinációs forró pontok, ezáltal hossz polimorfizmust okozhatnak. Ezen génekre specifikus primer-párok alkalmazásával (PCR-RFLP) a különböző törzsek között egyértelmű elkülönítés valósítható meg. A módszer más molekuláris markerek alternatívájaként, vagy kiegészítőjeként alkalmazható lehet (Marinangeli et al., 2004a).

Már korábban megfigyelték, hogy a *S. cerevisiae* egyes sejtalfehérjét kódoló génjeinek (*SEDI*, *AGAI*, *DAN4*, *HSP150*) hossza nagymértékben polimorf. A *SEDI* gén általános szerkezete nemzetségen belül konzervált, azonban a borélesztők *SEDI* génje nagymértékű hossz és szekvencia polimorfizmust mutat (Marinangeli et al., 2004b). PCR segítségével a szőlő mustból származó *S. cerevisiae* törzsek esetében 13 *SEDI* profilt állapítottak meg, amely 7 *SEDI* hosszvariáns különböző kombinációja révén jött létre. Az egyes *SEDI* hossz variánsok szekvencia analízise kimutatta, hogy ezek a *SEDI* gén különböző alléljai. A *SEDI* gén olyan a *Saccharomyces cerevisiae* stacioner fázisú sejtjeiben nagy mennyiségben jelenlévő sejtfa glikoprotein, amely két tandem ismétlődést tartalmaz a nukleotid szekvencia két különböző részén. A Sed1p gazdag szeroninban és treoninban, rendelkezik N- és C-terminális hidrofób domainnel, számos glikozilációs hellyel, valamint tartalmaz egy szignál szekvenciát a GPI-kapocs számára a C-terminális részen. Shimoi és mtsi. (1998) kimutatása alapján a Sed1p nem esszenciális a normális növekedéshez. Figyelembe véve, hogy a Sed1p a stacioner sejtekben van jelen, abban a fázisban, ahol a *S. cerevisiae* az alkoholos fermentációt végzi, feltételezhető, hogy a *SEDI* allélok különbözősége a borélesztők adaptációs mechanizmusa a számos környezeti stressztényezőre, amely a must fermentációja során áll fenn (Mannazzu et al., 2002).

2.11.5. DNS homológia vizsgálatok

A homológia két DNS molekula bázissorrendje közti általános hasonlóság értékelésére szolgál, a nukleotid-szekvencia tényleges ismerete nélkül. A melegítéssel szétválasztott egyszálú DNS-ek

hibridizációjának mértéke alkalmas a két szervezet DNS-e közti szekvencia-homológia számszerű kifejezésére. A homológia vizsgálatok az eukarióta sejteknél vagy a teljes genomból származó DNS-sel történnek (Deák, 2006), vagy pedig a PCR-rel felszaporított gének közti homológiát vizsgálják.

A heteroduplex analízis a rövid DNS szekvenciák közötti kis különbségek kimutatására alkalmas, amelyet eredetileg vírusok tanulmányozására fejlesztettek ki (Delwart et al., 1995). A HA analízis során a referencia DNS-t (általában PCR termék) ismeretlen szekvenciájú, hasonlóan rövid mintával keverik, majd a duplaszálú DNS hővel történő denaturálását követően, a hűtés folyamán a homológ egyszálú DNS szakaszok hibridizálódnak. A teljesen azonos nukleotid szekvenciák a hűtés folyamán homoduplex, a kisebb eltéréseket mutató szekvenciák pedig heteroduplex molekulákat eredményeznek. A heteroduplex molekulák konformációja a homoduplex molekulához képest torzulást mutat, amely poliakrilamid gélen kimutatható a heteroduplex molekulák lassabb vándorlása miatt (Zoller és Redila-Flores, *Bio-Rad Laboratories*). Olicio és mtsi. (1999) klinikai jelentőségű *Candida* fajok elkülöníthetőségéről tudósítottak az élesztők nagyfokú homológiát mutató 17S rDNS szekvencia HA analízisének segítségével. Ramos és mtsi. (2001) sikeresen alkalmazták a 26S rDNS D1/D2 régiójának heteroduplex analízisét a *Saccharomyces sensu stricto* csoport tagjainak elkülönítésére. Vizsgálatuk alapján az élesztők D1/D2 régiójának HA analízisével már a 2 % nukleotid eltérést mutató szekvenciák is megkülönböztethetőek.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a Tokaji szamorodni érlelése során kialakuló hártában jelenlévő hártaképző borélesztők fiziológiai, biokémiai és molekuláris biológiai jellemzését, valamint sherry és sherry-típusú borok hártaképző élesztőivel való összehasonlítását tűztem ki fő kutatási célként.

A kitűzött célok elérésében a következő lépéseket terveztem:

1. A Tokaji szamorodni érlelésében dominánsan részt vevő hártaképző élesztők izolálása
2. A Tokaji szamorodni hártaképző, a Sherry flor és a nem hártaképző borélesztők összehasonlítása molekuláris szinten:
 - a/ a hártaképző törzsek rDNS-ének analízise RFLP, illetve heteroduplex módszerek segítségével
 - b/ a hártaképző törzsek tipizálása és összehasonlítása RAPD módszer segítségével
3. A hártaképző borélesztők szaporodását és hártaképzését befolyásoló környezeti tényezők jellemzése, az optimális értékek meghatározása:
 - a/ a glükóz koncentráció hatásának tanulmányozása száraz és édes szamorodniból izolált törzsek esetében
 - b/ az etanol koncentráció hatásának a tanulmányozása
 - c/ a pH hatásának tanulmányozása
4. A hártaképző borélesztők sejtfal szerkezetének és funkciójának tanulmányozása:
 - a/ adhezív növekedés és álhifa képzés vizsgálata
 - b/ a borélesztők sejtfelszíni hidrofóbicitásának vizsgálata:
 - a pH hatásának tanulmányozása
 - a szaporodási fázis hatásának vizsgálata
 - a fehérjebontó enzimek hatásának meghatározása
 - az élesztősejtek elektron donor/elektron akceptor jellegének vizsgálata
 - c/ a hártaképző borélesztők sejtfelszíni fehérjeinek vizsgálata és összehasonlítása nem-hártaképző borélesztők sejtfal fehérjeivel
 - sejtfal fehérjék izolálása és elválasztása gélelektroforézissel
 - sejtfal fehérjék azonosítása immunblottolással
 - potenciális sejtfal fehérje gének összehasonlítása hártaképző és nem-hártaképző törzsek azonosított sejtfal fehérjei esetében

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Alkalmazott törzsek

2. táblázat: Alkalmazott törzsek

Kód	Típus	Földrajzi eredet	Származás
Laboratóriumi törzsek			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
CBS 1171	típustörzs		CBS ¹
S288c	genomiális adatbankban analizált		SzTE ²
SEY 6210	S288c-ből ered		ZE, BT ³
K1, K2, K28, KTA	killer törzsek		BCE, MBT ⁴
S6	killer-szuperérzékeny törzs		BCE, MBT
YHUM 272	invazív növekedésű törzs		SE ⁵
<i>Saccharomyces bayanus</i>			
CBS 380	típustörzs		CBS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> borélesztő törzsek			
PM 322	botritiszes borból izolálva	Tokaj régió	BCE, MBT
Badacsony1	borból izolálva	Badacsony régió	SzBKI ⁶
34/1.03	botritiszes borból izolálva (1999)	Tokaj régió	BCE, MBT
I/0/A; I/0/B; I/3/10; I/4/3; I/4/12; I/5/A; I/8/D; I/10/D; I/10/3; I/11/A; II/0/7; II/4/6; II/5/1; IV/8/z2	botritiszes borból izolálva (2002)	Tokaj régió	BCE, MBT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> hártaképző borélesztő törzsek			
B1	sherry bor	Spanyolország (Jerez)	BCE, BT ⁷
B3	sherry bor	Moldávia	KTM ⁸
B8	kereskedelmi sherry törzs	USA (Kalifornia)	BCE, BT
B4, B5	száraz szamorodni bor	Tokaj régió	SzBKI
B16	száraz szamorodni bor (1988)	Tokaj régió (Tolcsva)	BCE, BT
B22	száraz szamorodni bor (1995)	Tokaj régió (Bodrogkeresztúr)	BCE, BT
TD 01.1, TD 01.2	száraz szamorodni bor (2000)	Tokaj régió (Disznókő)	BCE, BT
TD 03; TD 04; TD 05	édes szamorodni bor (2000)	Tokaj régió (Disznókő)	BCE, BT

¹: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia

²: Szegedi Tudomány Egyetem Törzsgyűjteménye, Magyarország

³: Zágrábi Egyetem, Biokémia Tanszék, Horvátország

⁴: Budapesti Corvinus Egyetem, Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék, Magyarország

⁵: Stellenbosch Egyetem, Dél-Afrika

⁶: Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet, Kecskemét

⁷: Budapesti Corvinus Egyetem, Borászati Tanszék, Magyarország

⁸: Kisinevi törzsgyűjtemény, Moldávia

Előzetes vizsgálatok alapján elkülönülő, de csoporton belül azonos RAPD mintázatot adó *Saccharomyces cerevisiae* törzsek:

- I/0/A, I/0/B, I/11/A és II/0/7
- I/4/3 és I/4/12
- I/5/A, I/8/D és I/10/D
- II/4/6 és II/5/1

Killer tulajdonsággal rendelkező borélesztő törzsek:

I/4/12, I/11/A, II/0/7, II/5/1, IV/8/z2

4.2. Táptalajok, táplevesek

Komplett tápközeg [YEPD]

Pepton	5 g/l
Élesztőkivonat	5 g/l
Glükóz	10 g/l
Agar (szilárd táptalaj esetén)	20 g/l

Szénforrás mentes komplett tápközeg [YEP]: azonos a YEPD-del, glükóz nélkül

Hártyaképző tápleves [YEP(D)]

Pepton	5 g/l
Élesztőkivonat	5 g/l
Glükóz	5 g/l
Etanol (sterilezés után adagolva)	60 g/l
pH 3,3-as értékre beállítva HCl-val	

Tápleves erjesztési próbához

Pepton	10 g/l
Élesztőkivonat	10 g/l
Húskivonat	2 g/l
Vizsgálni kívánt szénhidrát	20 g/l

Metilénkékes táptalaj (killer aktivitás vizsgálatához)

Táptalaj :	Pepton	10 g/l
	Élesztőkivonat	5 g/l
	Glükóz	10 g/l
	Agar	20 g/l
	Desztillált víz	0,5 l-re kiegészítve
pH 4-es puffer rész::	0,1 M citromsav	30,7 ml
	0,2 M Na ₂ HPO ₄	19,3 ml
	Desztillált víz	0,5 l-re kiegészítve
Metilénkék oldat:	1ml/l (3 g metilénkéket 10 ml etanolban oldva, majd desztillált vízzel 100ml-re kiegészítve)	

A komponensek külön sterilizandók, majd sterilizés után 50 °C-on összemérendők.

Minimál tápközeg [MM]

(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5 g/l
Glükóz	10 g/l
Agar (szilárd táptalaj esetén)	20 g/l
Wickerham-féle vitaminkeverék	1 ml/l

Összetétel:

- 0,2 mg folsav
- 0,2 mg biotin
- 40 mg Ca-pantotenát
- 200 mg inozitol
- 40 mg nikotinsav
- 20 mg p-aminobenzoésav
- 40 mg piridoxin*HCl
- 40 mg tiamin*HCl
- 20 mg riboflavin
- 100 ml desztillált vízben oldva

Szénforrás mentes minimál tápközeg [MM-C]: azonos a MM-lal, glükóz nélkül

Na-acetátos spóráztató táptalaj

Pepton	2,5 g/l
Na-acetát	5 g/l
NaCl	0,62 g/l
Glükóz	0,62 g/l
Agar	20 g/l
Kloramfenikol	0,1 g/l

Ozmotikusan stabilizált komplett táptalaj [O-RM]

Pepton	20 g/l
Élesztőkivonat	10 g/l
Glükóz	20 g/l
CaCl ₂	0,6 M
Agar	20 g/l

Komplett tápleves fehérje izoláláshoz [RM]

Pepton	20 g/l
Élesztőkivonat	10 g/l
Glükóz	20 g/l

4.3. Oldatok

4.3.1. DNS munkákhoz alkalmazott oldatok

Sejtfeltárási puffer

NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

Felhasználás előtt hozzáadva: 1 % SDS
2 % Triton X-100

PCIA keverék

Pufferolt fenol:kloroform:izoamilalkohol 25:24:1 arányú keveréke

TE puffer

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA	1 mM

TBE puffer (10x)

Tris-base	108 g/l
Bórsav	54 g/l
0,5 M EDTA pH 8	10 ml

Annealing puffer (10x) (Delwart et al., 1995)

NaCl	1 M
Tris pH 7,8	100 mM
EDTA	20 mM

Felvívó festék(1) PCR termék gélelektroforéziséhez

Szacharóz	5 g
EDTA	50 mM
Brómfenolkék	10 mg
10 %-os SDS	10 µl
Desztillált víz	10 ml-re feltöltve

Felvívó festék(2) heteroduplex vizsgálatához

Brómfenolkék	5 mg
Xylene cyanol	5 mg
Glicerín	7 ml
Desztillált víz	10 ml-re feltöltve

4.3.2. Sejtalfehérje vizsgálatához alkalmazott oldatok

50 mM-os K-foszfát puffer (pH 8)

K_2HPO_4	16,512 g/l
KH_2PO_4	0,708 g/l

TM puffer (pH 7,5)

Tris-base	6 g/l
MgCl	10 g/l
(pH beállítása HCl-val)	

Laemmli puffer (5x)

Tris-base	0,75 g (pH beállítása 6,8-ra HCl-val)
EDTA-Na	95 mg
SDS	2,5 g
Bróm-fenolkék	1,25 mg
β -merkaptoetanol	6,25 ml
Glicerín	10 ml (csak elektroforézis puffer esetében)
Desztillált víz	25 ml-re feltöltve

Fehérje elektroforézis puffer (10x)

Tris-base	30 g/l
Glicin	144 g/l
SDS	10 g/l

Blotting puffer

$NaHCO_3$	1 g/l
Na_2CO_3	0,33 g/l
Metanol	200 ml

Membránmosó puffer pH 7,5

Tris-base	6 g/l
NaCl	8,8 g/l
(pH beállítása HCl-val)	
Triton X-100	1 ml
BSA	20 g/l

PonceauS festékoldat

PonceauS	0,1 g
5 %-os HAc	100 ml

Tris-HCl puffer (pH 8,8)

Tris-base	136,4 g/l
SDS	3g/l
(pH beállítása HCl-val)	

Tris-HCl puffer (pH 6,8)

Tris-base	16,8 g/l
SDS	1,1 g/l
(pH beállítása HCl-val)	

30 %-os akrilamid keverék

Akrilamid	300 g/l
Biszakrilamid	8 g/l

4.4. Gélelektroforézishez alkalmazott gélek

1,5 %-os agaróz gél

Agaróz	1,8 g
0,5x TBE puffer	120 ml
Etidium-bromid (10 mg/ml)	5,5 µl

Poliakrilamid gél (heteroduplex vizsgálathoz)

30 %-os akrilamid	16,7 ml
Glicerín	1 ml
Urea	6 g
10x TBE	10 ml
10 %-os APS	900 µl
TEMED	90 µl
Desztillált víz	100 ml-re feltöltve

Poliakrilamid gél (fehérje futtatáshoz)

Alsó gél (12 %-os):	Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
	30 %-os akrilamid keverék	3 ml
	Desztillált víz	2 ml
	TEMED	5 µl
	10 %-os ammónium-perszulfát	38 µl
Felső gél:	Tris-HCl pH 6,8	2,13 ml
	30 %-os akrilamid keverék	0,3 ml
	TEMED	5 µl
	10 %-os ammónium-perszulfát	22,5 µl

4.5. Módszerek

4.5.1. Hártyaképző borélesztő törzsek izolálása

A bodrogkeresztúri Bene pincészetben különböző évjáratú, hordóban érlelt szamorodni borok felületén található élesztőhártyából 10 ml mintát vettem. Háromtagú, 10x-es hígítási sort készítettem, majd a hígítási sorokból 0,1 ml szuszpenziót 0,1 g/l kloramfenikolt tartalmazó YEPD táptalajra szélesztettem.

4.5.2. Killer tulajdonság vizsgálata

A hártaképző borélesztő törzsek killer toxin termelésének vizsgálatához a *Saccharomyces cerevisiae* S6 killer szuperérzékeny törzs 10^7 sejt/ml-es szuszpenziójából 1 ml-t metilénkék táptalajon eloszlattam, majd a hártaképző törzsekből 1 kacsnyi mennyiséget ráoltottam csíkban.

A hártaképző borélesztő törzsek killer toxin érzékenységeinek vizsgálatához a hártaképző törzsek 10^7 sejt/ml-es szuszpenziójából 1 ml-t metilénkék táptalajon eloszlattam, majd a K1, a K2, a K28 és a KTA killer-toxin termelő *Saccharomyces cerevisiae* törzsekből 1 kacsnyi mennyiséget ráoltottam csíkban.

A kísérleteket két párhuzamosban készítettem el. A kiértékelést vizuálisan, a kifejlődött telep körüli feltisztulási zóna megfigyelésével végeztem el.

4.5.3. Meiospórák izolálása

A TD04 törzs 10^7 sejt/ml-es szuszpenziójából 0,1 ml-t spóráztató táptalajra szélesztettem, hogy spórázást indukáljak. A spórázás megtörténtét mikroszkóposan ellenőriztem. A spórákat 3 mg/ml lysing enzimet tartalmazó desztillált vízben szuszpendáltam és 37 °C-on 60 percig inkubáltam. Négy spórárt tartalmazó aszkuszkoból a spórákat mikromanipulátorral (Carls Zeiss Jena) YEPD és O-RM táptalajon széthúztam, majd a spórákból képződött telepeket izoláltam.

4.5.4. Genomi DNS izolálása [Hoffman és Winston (1987) módosított módszere alapján]

A törzsek 24 órás tenyészetéből egy nagy kacsnyi sejtet 1 ml desztillált vízben felsuszpendáltam. A sejteket maximális fordulatszámmal (14000 rpm) kicentrifugáltam, majd a sejtekre 200 µl sejteltáró-puffert, 0,3 g üveggyöngyöt (0,4-0,6 mm átmérőjű) és 200 µl PCIA-keveréket mértem. Az egészet 3 percig vortexeltem, majd 200 µl TE-puffert mértem hozzá és röviden összevortexeltem, végezetül maximális fordulatszámon 5 percig centrifugáltam. A felső vizes fázist 1 ml 96 %-os etil-alkoholba pipettáztam és 10 percig -20 °C-on inkubáltam. A kicsapódott nukleinsavat maximális fordulatszámon 5 percig kicentrifugáltam, a pelletre 50 µl TE-puffert mértem, majd 3 µl 10 mg/ml-es RN-áz hozzáadása után 30 percig 60 °C-on inkubáltam. Az RNS mentesített DNS-t ismételtén kicsaptam 1 ml 96 %-os etil-alkohollal, majd lecentrifugáltam. A DNS-t vákuumcentrifugában megszáritottam és 30 µl TE-pufferben visszaoldottam. Használatig -20 °C-on tároltam.

4.5.5. rDNS RFLP analízise

A faji identifikáláshoz az NS3-ITS4 primerpárral határolt rDNS szakaszt felszaporítottam PCR *Sprint* (Hybaid) készülékkel, majd a kapott PCR terméket az *MspI*, az *RsaI*, a *HaeIII* és az *ScrFI* restrikciós endonukleázokkal hasítottam.

Az rDNS ITS1 régiójának vizsgálatához az rDNS ITS1-ITS4 primerpárral határolt részét amplifikáltam, majd a PCR terméket a *CfoI*, a *HaeIII* és az *ScrFI* restrikciós endonukleázokkal hasítottam.

Az emésztéssel kapott fragmentumokat (11 µl) agaróz gélelektroforézissel választottam el 3 µl felvivő festék(1) hozzáadásával, 120 V-on 110 perces futtatással, 0,5x TBE-pufferben.

A PCR reakciókat 30 µl végtérfogatban végeztem, a következő összetétellel: 1x DNS-polimeráz puffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,16 mM az egyes dNTP-ékből (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 15 pM az egyes primerekből; 1U DNS-polimeráz (DyNAzyme, Finnzymes) és 2,5 µl genomi DNS.

Az alkalmazott primereket a **3. táblázat** tartalmazza.

A PCR reakció paraméterei az rDNS felszaporításához:

Elődenaturáció: 95 °C, 5 perc

Amplifikáció (35 ciklus): Denaturáció: 95 °C, 30 másodperc

Primer kötődés: 60 °C, 30 másodperc

Lánchosszabbítás: 72 °C, 1 perc

Végző lánchosszabbítás: 72 °C, 7 perc

A restrikciós emésztéseket 37 °C-on, 4 órán keresztül végeztem 11 µl végtérfogatban, a következő összetétellel:

8 µl enzim mix (1 µl puffer; 0,2 µl enzim; 7 µl desztillált víz elegyből)

3 µl PCR termék

Az alkalmazott restrikciós enzimeket és jellemzőiket a **4. táblázat** tartalmazza.

4.5.6. Heteroduplex analízis

A hártvaképző borelesztő törzsek rDNS polimorfizmusának megállapításához az rDNS ITS1-ITS2 (**3. táblázat**) primerpárral határolt részét szaporítottam fel a 4.4.5. fejezetben leírtak szerint. Egyedüli változtatásként a lánchosszabbítás idejét 30 másodpercre csökkentettem a PCR reakció során.

A homo- illetve heteroduplex előállításához a különböző törzsek PCR termékeiből 4,5-4,5 µl-nyit összekevertem, és 1 µl-nyi annealing puffer hozzáadása után a duplaszálú DNS fragmentumokat hővel denaturáltam, majd lassan renaturáltam PCR készülékben történt programozott hűtés segítségével.

A denaturáció és renaturáció paraméterei a heteroduplex analízishez Leoni és mtsi. (2003) módszere alapján kisebb módosítással:

Denaturáció: 94 °C, 5 perc

Lehűtés: 2 °C/30 másodperc 24 °C-ig

A kapott termékeket poliakrilamid gélen választottam el 3,5 µl felvivő festék(2) hozzáadásával, 160 V-on 3 órás futtatással (DCode System), 1x-es TBE-pufferben Yao és mtsi. (2002) módszere alapján kisebb módosítással.

4.5.7. RAPD analízis

A hártaképző borélesztő törzsek összehasonlítása céljából az amplifikálást random primerek és mikroszatellit primerek segítségével is elvégeztem. Az alkalmazott primerek tulajdonságait a **3. táblázat** tartalmazza.

A PCR reakciókat 30 µl végtérfogatban végeztem, a következő összetétellel: 1x DNS-polimeráz puffer; 2,5 mM MgCl₂; 0,16 mM az egyes dNTP-ékből (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 15 pM az egyes primerekből; 1U DNS-polimeráz (DyNAzyme, Finnzymes) és 2,5 µl genomi DNS.

A PCR reakció paraméterei:

Elődenaturáció: 95 °C, 5 perc

Amplifikáció (35 ciklus): Denaturáció: 95 °C, 30 másodperc

Primer kötődés: **3. táblázat** szerinti hőmérséklet, 30 másodperc

Lánchosszabbítás: 72 °C, 2 perc

Végső lánchosszabbítás: 72 °C, 7 perc

A kapott PCR termékekből 10 µl-t agaróz gélelektroforézissel választottam el 3 µl felvivő festék(1) hozzáadásával, 120 V-on 110 perces futtatással, 0,5x TBE-pufferben.

3. táblázat: Alkalmazott primerek és jellemzőik

Primer jelölése	Nukleotid szekvencia (5'-3')	GC%	Primer kötődés hőfoka [°C]
<i>rDNS primer</i>			
NS3	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC	67	60
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	63	60
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	55	60
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	45	60
<i>RAPD primer</i>			
OPE2	GGTGCGGGAA	70	38
OPE14	TGCGGCTGAG	70	38
OPE16	GGTGACTGTG	60	37
OPA1	CAGGCCCTTC	70	38
P50	GCAAGTAGCT	50	37
P60	CGGTCACGT	60	37
P70	AGCGGGCGTA	70	38
P80	CGCGTGCCCA	80	40
<i>Mikroszatellit primer</i>			
(GTG) ₃	GTGGTGGTG	60	37
(GACA) ₄	GACAGACAGACAGACA	50	37

4. táblázat: Alkalmazott restrikciós endonukleázok tulajdonságai

Restrikciós enzim	Felismerő és hasítási hely
<i>Msp</i> I (Promega)	5' ...C [▼] CGG...3'
<i>Rsa</i> I (Promega)	5' ...GT [▼] AC...3'
<i>Hae</i> III (Promega)	5' ...GG [▼] CC...3'
<i>Sac</i> FI (New England BioLabs)	5' ...CC [▼] NGG...3'
<i>Cfo</i> I (Fermentas)	5' ...GCG [▼] C...3'
<i>Kpn</i> I (Amersham)	5' ...GGTAC [▼] C...3'

4.5.8. Erjesztési próba (Barnett et al., 2000)

A különböző szénhidrátok (glükóz, szacharóz, galaktóz és laktóz) erjesztésének vizsgálatához a törzsek 10⁷ sejt/ml-es szuszpenziójából 0,1 ml-nyi mennyiséget oltottam be Durham-csövet

tartalmazó 10 ml erjesztési táplevesbe. Az alkoholos erjedés megtörténtét – a CO₂ képződést vizsgálva – 1 héten keresztül követtem nyomon. A kísérletet két párhuzamosban végeztem el.

4.5.9. A hártyaképző borélesztők szaporodását befolyásoló környezeti tényezők vizsgálata

A környezeti tényezők szaporodásra gyakorolt hatását MULTISKAN ASCENT (Thermo, Electron Corporation) mikrolemezes készülékkel vizsgáltam, amelynek során 10⁷ sejt/ml kiinduló sejtszámú táplevesek optikai denzitását mértem 25 °C-os inkubálás mellett, 595 nm-en 30 perces intervallummal, a mérések előtt egy rövid 20 másodperces rázással. A kísérletet három párhuzamos mintával végeztem el.

Glükóz koncentráció hatásának vizsgálata

5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 és 200 g/l glükózt tartalmazó MM-C táplevesben vizsgáltam az élesztőtörzsek szaporodását 24 órán keresztül. Kontrollként szénforrást nem tartalmazó MM-C táplevest alkalmaztam.

Etanol koncentráció hatásának vizsgálata

3, 6, 9, 12, 15 és 18 % etanolt tartalmazó MM táplevesben vizsgáltam különböző élesztőtörzsek szaporodását 24 órán keresztül. Kontrollként etanolt nem tartalmazó MM táplevest alkalmaztam.

pH hatásának vizsgálata

3-as, 4-es, 5-ös, 6-os és 7-es pH értékre pufferelt (McIlvain puffer) MM táplevesben vizsgáltam különböző élesztőtörzsek szaporodását 24 órán keresztül.

4.5.10. A hártyaképző borélesztők hártyaképzését befolyásoló környezeti tényezők vizsgálata

A MM-C illetve a MM tápleves nem bizonyult megfelelőnek a hártyaképzéshez, ezért a hártyaképzést minden esetben YEP illetve YEP(D) táplevesben végeztem 10⁷ sejt/ml-es kiindulási sejtszámmal 20 °C-on ráztatás nélkül. A kísérletet két párhuzamosban végeztem el.

A hártyaképzés nyomon követése vizuálisan történt, az alábbiak szerint:

- (+): a tápleves felszínén néhány sejt hártyává kezd összeállni
- ++: a tápleves felszínének 1/3-át élesztőhártya borítja
- +++: a tápleves felszínének 2/3-át élesztőhártya borítja
- ++++: a tápleves felszínének egészét élesztőhártya borítja

Glükóz koncentráció hatásának vizsgálata

5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 és 200 g/l glükózt tartalmazó YEP táplevesben vizsgáltam a hártaképzést 30 napon keresztül. Kontrollként szénforrást nem tartalmazó YEP táplevest alkalmaztam.

Etanol koncentráció hatásának vizsgálata

3, 6, 9, 12, 15, 16, 17 és 18 % etanolt tartalmazó YEP táplevesben vizsgáltam 5 g/l glükóz koncentráció mellett a hártaképzést 7 napon keresztül. Kontrollként etanolt nem tartalmazó YEP(D) táplevest alkalmaztam.

pH hatásának vizsgálata

3-as, 4-es, 5-ös, 6-os, 7-es, 8-as és 9-es pH értékű YEP(D) táplevesben vizsgáltam a hártaképzését 7 napon keresztül.

4.5.11. A sejthozam meghatározása

Az élesztőtörzseket 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 és 200 g/l glükóz koncentrációjú YEP levesben tenyésztettem 30 °C-on, 180 rpm-mel rázatva. A tenyésztést követően a sejteket kicentrifugáltam, desztillált vízzel mostam és 105 °C-on 24 óra alatt kiszáritottam. A szárított élesztő mennyiségét visszamérve megállapítottam az egységnyi szénforrásból keletkező hozamot.

$$\text{Sejthozam}(Y) = \frac{\text{Száras sejtömeg}[\text{g} / \text{l}]}{\text{Glükóz}[\text{g} / \text{l}]}$$

4.5.12. A sejtfelületi hidrofóbicitás meghatározása [van der Mei és mtsi. (1993) módosított módszere alapján]

A vizsgálandó törzsek sejtjeit poláros oldószerben (vizes közegben) szuszpendáltam kb. OD₆₀₀=0,5-ös értékre, majd apoláros oldószer hozzáadása után intenzíven kevertem. A vizes fázis keverés előtti és a keverés utáni OD értékének mérésével, az alábbi egyenlet alapján meghatároztam a törzsek hidrofóbicitási indexét:

$$H_i = \log\left(\frac{A_t}{A_0} * 100\right) \quad \text{ahol} \quad \begin{array}{l} A_t: \text{vizes fázis OD}_{600} \text{ értéke keverés után} \\ A_0: \text{vizes fázis OD}_{600} \text{ értéke keverés előtt} \end{array}$$

Poláros oldószerként 10 mM-os KH_2PO_4 -ot (pH 3,3), míg apoláros oldószerként xilolt alkalmaztam.

A sejtek felszíne $H_i > 2$ felett hidrofóbnak tekinthető. Mintánként három párhuzamos mérést végeztem.

Elsőként a mérés optimalizálását végeztem el. Az optimális keverési idő megállapításához, a poláros-apoláris fázisok 1:1 arányú keverékét eltérő ideig (10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150 és 180 másodperc) kevertem. Az optimális poláros-apoláros fázis arányának meghatározásához, a poláros fázishoz – a poláros fázis mennyiségét 100 %-nak véve – eltérő mennyiségű (2,5; 5; 7,5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 és 100 %) apoláros oldószert adagoltam.

pH hatásának vizsgálata a hidrofóbicitásra

A törzsek poláros oldószerben való felszuszpendálása előtt a K-foszfát pH-ját HCl illetve KOH segítségével 2-es, 3-as, 4-es, 5-ös, 7-es és 9-es értékre állítottam be.

A hidrofóbicitás változásának vizsgálata a szaporodás során

A törzsek hidrofóbicitásának változását a szaporodás első 8 órájában követtem nyomon. A tenyésztést 30 °C-on végeztem 180 rpm-es kevertetés mellett YEPD illetve YEP(D) táplevesben.

Enzimes kezelés hatásának vizsgálata a hidrofóbicitásra

A hártvaképző törzsek sejtjeit 200 µg/ml-es *Trichoderma* lysing (Sigma), 10 µg/ml-es *Arthrobacter* litikáz (Sigma), 200 µg/ml-es proteinázK (Sigma), 200 µg/ml-es pronázE (Sigma), 100 µg/ml-es tripszin (Sigma) és 100 µg/ml-es kimotripszin (Sigma) oldatba vettem fel, majd 37 °C-on inkubáltam 1,5 órán keresztül. A kezelést követően a sejteket mostam, majd meghatároztam a hidrofóbicitásukat. Kontrollként kezeletlen sejteket alkalmaztam.

Lewis sav-bázis kölcsönhatás meghatározása (MATS módszer) [Briandet és mtsi. (1999) módosított módszere alapján]

A vizsgálathoz a mosott sejteket 10^7 sejt/ml-es koncentrációban szuszpendáltam 0,15 M-os NaCl oldatban, majd a szuszpenzió 2,4 ml-éhez 0,4 ml-nyi oldószert mértem (kloroform, etil-acetát, hexadekán vagy dekán). A kétfázisos rendszert 60 másodpercig vortexeltem, majd vizes fázis keverés előtti és a keverés utáni OD értékének mérésével, az alábbi egyenlet segítségével kiszámítottam a sejtek különböző oldószerhez való affinitását:

$$\text{Affinitás}[\%] = 100 * \left(1 - \frac{A_t}{A_0} \right) \quad \text{ahol} \quad \begin{array}{l} A_t: \text{vizes fázis OD}_{400} \text{ értéke keverés után} \\ A_0: \text{vizes fázis OD}_{400} \text{ értéke keverés előtt} \end{array}$$

4.5.13. Az invazív növekedés és az adhézió vizsgálata

Polisztirolhoz való adhézió vizsgálata [Reynolds és Fink (2001) módosított módszere alapján]

A vizsgálathoz a tenyésztést polisztirol Petri-csészében végeztem, amelynek során a hártaképző törzseket folyékony YEPD táplevesbe oltottam le 10^7 sejt/ml-es koncentrációban. 1, 2 illetve 3 napos 20 °C-on történő tenyésztést követően a Petri-csészék tartalmát kiöntöttem, a Petri-csészét gyenge sugarú csapvízzel mostam. A polisztirolhoz rögzült sejteket először etanol-éter 1:1 arányú keverékével előltem, majd metilén-kék oldattal festettem és mikroszkóp alatt vizsgáltam.

Üveghez való adhézió vizsgálata [Mercier-Bonin és mtsi. (2004) módosított módszere alapján]

A vizsgálatához a tenyésztést egy 2,1 cm átmérőjű centrifugacsőben végeztem el. A centrifugacső egy, a vízszintessel kb. 60°-os szöget bezáró fedőlemezt tartalmazott (1,8x1,8 cm). A leoltás YEPD táplevesbe történt 10^7 sejt/ml-es koncentrációban. 1, 2 illetve 3 napos 20 °C-on történő tenyésztést követően a fedőlemezt eltávolítottam a táplevesből, majd gyenge sugarú csapvízzel mostam, a rögzült sejteket etanol-éter keverékével előltem, metilén-kék oldattal festettem és mikroszkóp alatt vizsgáltam.

Adhezív/Invazív növekedés vizsgálata [Roberts és Fink (1994) módosított módszere alapján]

A törzsek 10^7 sejt/ml-es szuszpenziójából 10 µl-t felcseppentettem YEPD táptalaj felületére, majd 3 napig 30 °C-on inkubáltam. A tenyésztést követően a táptalaj felületét gyenge sugarú csapvízzel mostam.

4.5.14. Sejtfalfehérjék biotines jelölése és izolálása [Mrsa és mtsi. (1997) módosított módszere alapján]

A hártaképző borélesztő törzseket RM táplevesben tenyésztettem, illetve YEP(D) táplevesben hártaképzést indukáltam. A sejteket a táplevesből kicentrifugáltam, majd kétszer desztillált vízzel, illetve kétszer 50 mM-os K-foszfát pufferrel mostam. A sejtfelületen található fehérjéket biotinnel (NHS-LC-Biotin, Pierce, Rockford, USA) jelöltem (0,002 mg biotin/1 OD) 90 percig jégen, 4 °C-on történő inkubálás során. A felesleges, fehérjéhez nem kötődött biotint eltávolítottam kétszer TM-pufferrel és kétszer 50 mM-os K-foszfát pufferrel való mosással.

A jelölt sejtfalfehérjék izolálásához, a sejteket egységnyi térfogat 50 mM-os K-foszfát pufferben szuszpendáltam, majd 10 perces üveggyöngyös (0,4-0,5 mm) vortexeléssel feltártam. Az összetört sejtfalat centrifugálással visszanyertem és 5-ször 50 mM-os K-foszfát pufferrel mostam, hogy az

intracelluláris fehérjéket minél jobban eltávolítsam. A sejtfalhoz kötődött fehérjéket három módszerrel vontam ki.

Nem kovalensen kötődött fehérjék kinyerése: A jelölt és mosott sejtfalat 500 µl Laemmli-pufferben szuszpendáltam, majd 95 °C-on 10 percig hőkezelttem. A hőkezelés után a sejtfalat kicentrifugáltam, a felülúszót óvatosan leszívtam pipettával, ez képezte az SDS1-es frakciót, ami tartalmazta a kovalensen nem kötődő fehérjék jelentős részét. A maradék nem kovalensen kötődő fehérje eltávolításához, az eljárást megismételtem, ennek eredményeként megkaptam az SDS2-es frakciót. A kezelt sejtfalat ezután ismét mostam 50 mM-os K-foszfát pufferrel 5-ször.

Kovalensen kötött fehérjék kivonása: Kétféle módszert alkalmaztam.

- a) A Laemmli-pufferrel kezelt sejtek felét 50 mM-os Tris-HCl-dal (pH 7,4) mostam, majd szuszpendáltam (100 µl /75 OD). A szuszpenzióhoz β-1,3-glükanázt (Quantazyme, Qbiogene, Germany) adtam (0,1 IU/1 OD) és a sejtfalat 37 °C-on 2 óráig emésztettem. Az inkubációt követően, a sejtfal kicentrifugálása után a felülúszó képezte a glükanázos frakciót.
- b) A Laemmli-pufferrel kezelt sejtek másik felét desztillált vízzel mostam, majd 30 mM-os NaOH-ban szuszpendáltam (100 µl /75 OD) és 1 éjszakán keresztül 4 °C-on inkubáltam. A kezelést követően a szuszpenziót 1 M-os HCl-val semlegesítettem, és a sejtek kicentrifugálása után megkaptam a NaOH-os frakciót (felülúszó).

4.5.15. Sejtfalfehérjék elválasztása és Western-blot analízise

A sejtfalfehérjék elválasztását 12 %-os SDS-poliakrilamid gélen végeztem 150 V-on 1-1,5 órás futtatással 1x-es fehérje elektroforézis pufferben. Mintafelvétel előtt a fehérje frakciókhoz 5 µl Laemmli-puffert(5x) adtam és 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. A felvitt minta mennyiségek:

SDS frakció:	< 1 µl
Glükanáz frakció:	5-10 µl
NaOH frakció:	2-10 µl

A gélelektroforézis után az elválasztott fehérjéket hidrofíl nitrocellulóz membránra (Amersham) blottoltam 380 mA-en 2 órán keresztül blotting pufferben. A blottolás után a fehérje méret standardot PonceauS festékoldattal előhívtam, majd a membránt membránmosó pufferrel mostam 4 °C-on 1 órán keresztül. A biotinnel jelölt fehérjékhez 0,2 µl/ml avidint (Streptavidin-Horseradish-Peroxidase Conjugate, Amersham) konjugáltattam membránmosó pufferben, majd a felesleges avidint eltávolítottam membránmosó pufferrel való háromszori 10 perces mosással. A jelölt

fehérjéket ECLTM „Western Blotting Detection Reagents” (Perkin-Elmer) segítségével vizualizáltam filmen.

4.5.16. A *HSP150* gén RFLP analízise

A Ccw7-es sejtalfehérjét kódoló gén (*HSP150/CCW7/PIR2*) szekvenciáját a *S. cerevisiae* genomiális adatbankból, a <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/seqTools> oldalról töltöttem le. A *HSP150* génszakaszra specifikus primer-pár tervezését a <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer> oldalon található primer-tervező programmal végeztem.

A PCR reakciókat 30 µl végtérfogatban végeztem, a következő összetétellel: 1x DNS-polimeráz puffer; 1,5 mM MgCl₂; 0,16 mM az egyes dNTP-ékből (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 15 pM az egyes primerekből (C7-f és C7-r); 1U DNS-polimeráz (DyNAzyme, Finnzymes) és 2,5 µl genomi DNS

A PCR reakció paraméterei:

Elődenaturáció: 95 °C, 5 perc

Amplifikáció (35 ciklus): Denaturáció: 95 °C, 30 másodperc

Primer kötődés: 56 °C, 30 másodperc

Lánchosszabbítás: 1 perc

Végso lánchosszabbítás: 72 °C, 7 perc

A PCR termékek restrikciós analízisét a *Hae*III, az *Rsa*I és a *Kpn*I endonukleázokkal készítettem el.

Az emésztést 37 °C-on, 4 órán át végeztem 11 µl végtérfogatban, a következő összetétellel:

8 µl enzim mix (1 µl puffer; 0,2 µl enzim; 7 µl desztillált víz elegyből)

3 µl PCR termék

Az alkalmazott restrikciós enzimek jellemzőit a **4. táblázat** tartalmazza.

A PCR termékeket (3 µl) és az emésztéssel kapott fragmentumokat (11 µl) agaróz gélelektroforézissel választottam el 3 µl felvivő festék(1) hozzáadásával, 120 V-on 110 perces futtatással, 0,5x TBE-pufferben.

A felszaporított *HSP150*-es gén szekvenálásához a PCR termékeket a PCR-MTM Clean Up System (Viogene) segítségével tisztítottam. A szekvenálást a Gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont végezte el ABI PRISM 3100 szekvenáló segítségével.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Hártyaképző borélesztő törzsek izolálása tokaji szamorodni felületéről

Élesztőtörzsek izolálásához a bodrogkeresztúri Bene Pincészetben összesen 10 hordóból, az érlelési fázisban lévő száraz és édes szamorodni bor felszínéről vettem mintát, amelyeket kloramfenikolt tartalmazó YEPD táptalajra szélesztettem. Nem sikerült minden esetben élesztősejteket izolálnom, az M13-as illetve a 02/58-as jelzésű hordókból vett minták nem tartalmaztak élő élesztősejtet. A többi hordó esetében Petri-csészénként lehetőség szerint 2-2 reprezentatív telepet izoláltam (5. táblázat). A 02/62 hordó kivételével, valamennyi izolátum száraz szamorodni felületéről származott. Az izolátumok hártyaképzését 6 % etanolt tartalmazó YEPD táplevesben tesztelve azt tapasztaltam, hogy mindegyik képes volt a tápleves felszínén összefüggő hártyát kialakítani, tehát hártyaképző borélesztő törzseknek tekinthetők.

5. táblázat: A bodrogkeresztúri Bene Pincészetből izolált élesztőtörzsek

Vizsgált hordó	Évjárat	Bor tulajdonságai	Izolált minták
M2	1996	Savtartalom: 9 Cukortartalom: 2,3 g/l	M2.1 (sima telep) M2.2 (rögös telep)
M4	1996	Savtartalom: 9 Cukortartalom: 2,3 g/l	M4.1 M4.2
M7	1995	Savtartalom: 9 Cukortartalom: 1,4 g/l	M7.1 M7.2
M10	1995	Savtartalom: 9 Cukortartalom: 1,4 g/l	M10
M12	1996	Savtartalom: 9 Cukortartalom: 2,3 g/l	M12.1 (nagy telep) M12.2 (kis telep)
M17	2000	Savtartalom: 7,4 Cukortartalom: 2,2 g/l	M17.1 (nagy telep) M17.2 (kis telep)
M21	2000	Savtartalom: 7,4 Cukortartalom: 2,2 g/l	M21
02/62	1999	Savtartalom: 10,2 Cukortartalom: 59 g/l	02/62.1 (nagy telep) 02/62.2 (kis telep)

A további vizsgálatokhoz a 2. táblázatban bemutatott törzsgyűjteményből származó hártyaképző élesztőgomba törzseket is bevontam, amelyek közül egy sherry hártyából, kettő egyéb borhártyából, hat száraz szamorodniból, három pedig édes szamorodniból származott.

5.2. A hártaképző borélesztő törzsek jellemzése killer tulajdonság és morfológiai szempontból

5.2.1. A hártaképző élesztők killer tulajdonságának vizsgálata

A killer tulajdonság elterjedt a *Saccharomyces cerevisiae* borélesztő törzsek esetében. A hártaképzők killer aktivitását az S6-os szuperérzékeny törzzsel szemben vizsgáltam. A 26 izolátum közül egyedül a B3 törzs gátolta az S6-os törzs szaporodását. A *S. cerevisiae* esetében eddig 3-féle killer típust (K1, K2, K28) írtak le részletesen. A hártaképző élesztők killer toxin érzékenységeinek szűrését mind a háromféle toxint termelő törzsre, valamint a tanszékünk által izolált és jellemzett új típusú KTA törzsre (Perkátai et al., 2003) nézve is elvégeztem. A vizsgált hártaképzők többsége nem volt érzékeny egyik toxinra sem. Egyedül a TD01.1 törzset gátolta a K2, a KTA és kismértékben a K1 killer törzs.

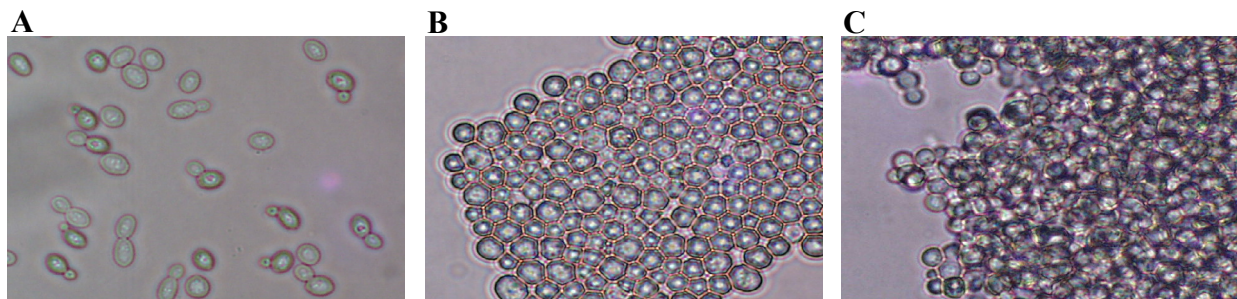
5.2.2. A hártaképző élesztők spóráképzése

A hártaképző izolátumaim mindegyike spórázó diploidnak bizonyult, igaz az aszkuszképzés gyakorisága nagyon kicsike volt, valamint sok volt az aberráns tetrád. A TD04 hártaképző borélesztő esetében a spórázás indukálása után (Na-acetátos táptalajon) 21 db 4 spórárt tartalmazó aszkuszt mikromanipulátorral szétszedtem és YEPD, valamint O-RM táptalajra vittem. A spórák túlélése azonban nagyon kicsi volt, nem sikerült egyetlen egy komplett tetrádot sem kitenyésztenem, csak három vagy kevesebb spóra képzett telepet egy aszkuszból. A telepet képző haploidokat visszaizoláltam és a későbbi vizsgálataimba (hártaképzés, hidrofóbicitás, invazív növekedés, rDNS analízis, *HSP150* gén analízise) bevontam.

5.2.3. A hártaképző élesztők mikroszkópos és makroszkópos jellemzése

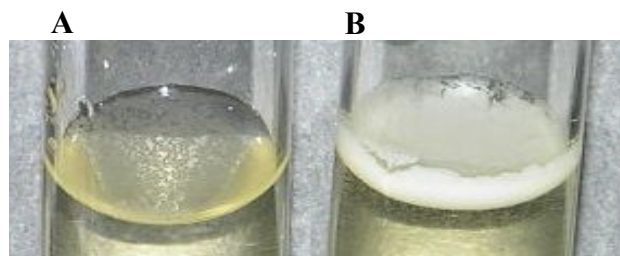
A hártaképző élesztők sejtjei az exponenciális fázisban a *Saccharomyces cerevisiae* fajra jellemző ovális alakkal rendelkeznek **6. ábra (A)**. Hártaképzés során (stacioner fázis) a sejtek lekerekednek, a korai fázisában a sejtek egy egyrétegű (egydimenziós) hálót alkotnak, amelyben a sejtek szorosan összekapcsolódnak. A szoros összekapcsolódás következtében a sejtek látszólag elveszítik kerek

alakjukat és sokszögűeknek látszódnak (**6. ábra (B)**). A hártvaképzés előrehaladtával a sejtek nemcsak egy síkban kapcsolódnak össze, hanem egy háromdimenziós hártvát alakítanak ki (**6. ábra (C)**).



6. ábra: A TD04 hártvaképző mikroszkópos képe A/ planktonikusan szaporodó sejtek B/ 1 napos fiatal hártvában lévő sejtek C/ 1 hetes öreg hártvában lévő sejtek

A sejtek hártvává való összeállása, valamint a hártva öregedése makroszkopikusan is megfigyelhető. A kezdeti fázisban a sejtek szigeteket alakítanak ki a tápközeg felszínén (**7. ábra (A)**), majd a szigetek közötti rés kitöltődik további sejtekkel, és az idő előrehaladtával a kialakult hártva megvastagodik (**7. ábra (B)**), a sejtek több réteget alkotnak. Az érett hártva érzékeny a mechanikai hatásokra, rázásra könnyen összetöredezik, a hártvadarabok pedig a nagyobb fajsúlynak köszönhetően leülepednek. Mechanikai hatásra összetöredezett hártva pótlódik, a leülepedő sejtek képesek újabb hártvát kialakítani a folyadék felszínén.

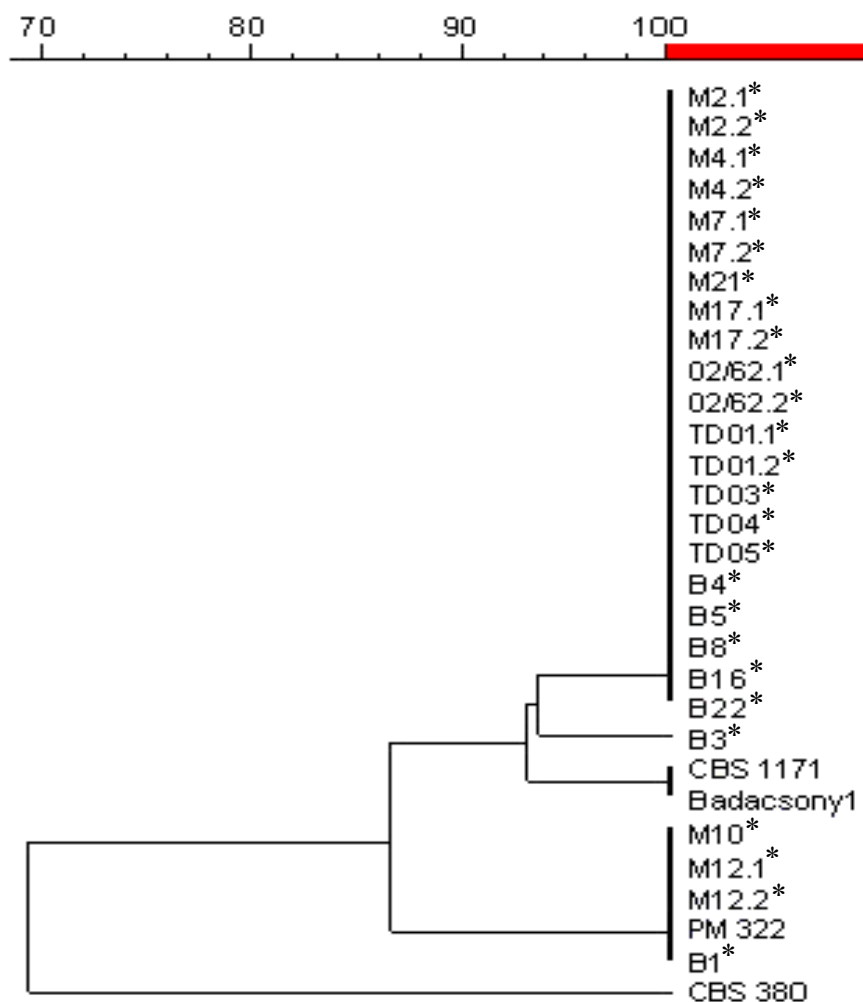


7. ábra: A TD04 hártvaképző által képzett hártva makroszkopikus képe A/ fiatal hártva B/ öreg hártva

A TD04 diploid törzs spóráztatása után kapott haploidok hártvaképzését vizsgálva azt tapasztaltam, hogy a meiotikus szegregánsok mindegyike képes volt hártvát kialakítani, a hártvaképzés gyorsaságában és mértékében nem találtam különbséget az egyes haploidok és a diploid szülői törzs között.

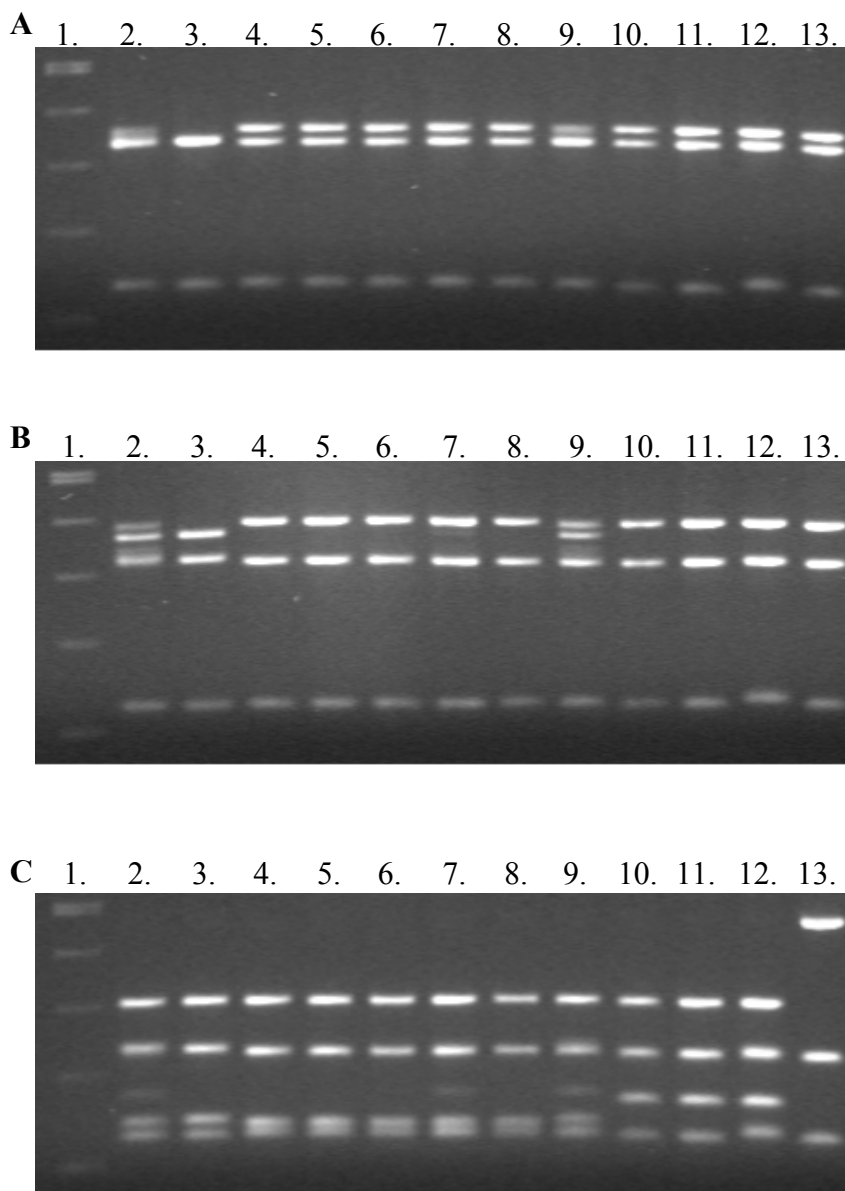
5.3. Az rDNS RFLP analízise

Az általam izolált hártvaképző borélesztők faji azonosítását a riboszómális DNS NS3-ITS4 primer-párral határolt részének felszaporításával, majd az azt követő restrikciós analízisével (*MspI*, *RsaI*, *HaeIII* és *ScrFI*) végeztem el. A hártvaképzők a CBS 1171 *S. cerevisiae* típustörzzsel 87 %-os, illetve 93 %-os (**8. ábra**), míg a CBS 380 *S. bayanus* típustörzzsel csak 69 %-os hasonlóságot mutattak, tehát a *Saccharomyces cerevisiae* fajhoz tartoznak. A vizsgált kontroll borélesztők szintén 69 %-os hasonlósági szintnél váltak el a *S. bayanus* típustörzstől. A PM 322 a *S. cerevisiae* típustörzzsel 87 %-os, míg a Badacsony1 100 % hasonlóságot mutatott.



8. ábra: rDNS 18S-ITS régió RFLP analízisének kombinált dendrogramja (Molecular Analyst Software, BioRad). A hártvaképző törzseket * jelöli.

Fernandez-Espinar és mtsi. (2000) vizsgálata szerint a sherry flor élesztők egyértelműen elkülöníthetők voltak a nem hártvaképző borélesztőktől az ITS1 régióban található 24 bp-os deléciónak köszönhetően, amely specifikus, úgynevezett flor mintázatot eredményez ARDRA analízis során. Annak érdekében, hogy megállapítsam, hogy a szamorodni eredetű hártvaképző borélesztők rDNS ITS-5.8S régiójában megtalálható-e a jelzett deléción, a PCR termékeket a *Cfo*I, a *Scr*FI és a *Hae*III endonukleázokkal emésztettem. A PCR reakció eredményeként 820 bp-os terméket kaptam. A termékek restrikciós mintázatára a **9. ábrán** látható példa.

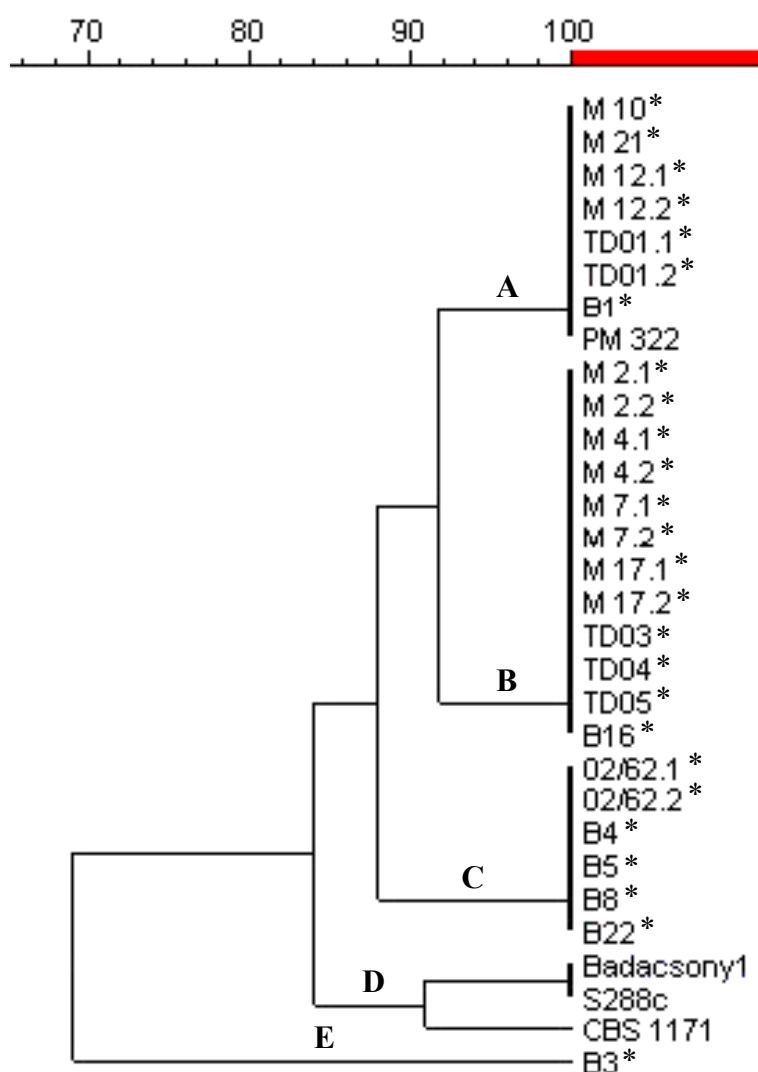


9. ábra: Borélesztők és kontroll törzsek rDNS ITS-5.8S régiójának restrikciós mintázata. A/ *Cfo*I B/ *Scr*FI C/ *Hae*III enzimes emésztés után

1. Marker (100bp létra), 2. B1*, 3. B3*, 4. B4*, 5. B5*, 6. B8*, 7. B16*, 8. B22*, 9. PM 322, 10. Badacsony1, 11. S288c, 12. CBS 1171, 13. CBS 380

*: hártvaképző borélesztők

Vizsgálatom szerint a 26 hártýaképző borélesztő közül egyedül a B3 (moldáviai) törzs mutatja ezt a mintázatot (**9 ábra (A)**, 3. minta), míg a másik két sherry törzs (spanyol, amerikai) mintázata ettől eltért. A szamorodni hártýaképző törzsek kombinált mintázata eltér mind a leírt flor mintázattól, mind a *S. cerevisiae* típustörzs és laboratóriumi törzsek mintázatától. A törzsek *CfoI* enzimmel kapott mintázata, valamint az *ScrFI* enzim esetében a hártýaképzők jelentős része (18 törzs) a *S. cerevisiae* tipikus mintázatát mutatta. A *HaeIII* enzimekkel kapott restriktációs mintázat azonban egyik esetben sem azonos a *S. cerevisiae* esetében megfigyelt mintázattal, sőt sok esetben a flor, illetve a *S. cerevisiae* mintázat keverékének tűnt. A három restriktációs enzimmel kapott mintázat alapján készített kombinált dendogramot a **10. ábra** szemlélteti.



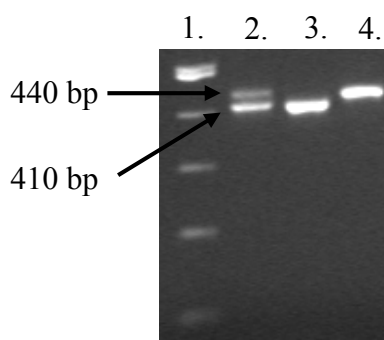
10. ábra: rDNS ITS-5.8S régió RFLP analízisének kombinált dendogramja. A hártýaképző törzseket * jelöli.

A hártvaképző borélesztők négy csoportot alkotnak (A, B, C és E). A négy csoport egyértelműen elkülönül mind a CBS 1171 típusörzstől, mind a S228c laborörzstől. A Badacsony1 jelzésű borélesztő a S288c laborörzsszel alkotott egy csoportot (D klaszter), míg a PM 322 borélesztő meglepő módon az A klaszterba tartozó hártvaképzőkkel mutatott azonos mintázatot. A tipikus flor mintázatot mutató hártvaképző élesztő (B3) egyedül alkotott egy klasztert (E klaszter), amely a többi hártvaképzőtől 69 %-os homológia szinttel elkülönült.

5.4. Az rDNS homológia vizsgálata heteroduplex analízissel

A heteroduplex analízis DNS szekvenciák közötti kis különbségek kimutatására is alkalmas, ezért feltételeztem, hogy a sherryből izolált hártvaképző élesztőkben jelen lévő 24 bp-os deléción (Fernandez-Espinar et al., 2000) is kimutatható a segítségével. Mivel a heteroduplex analízis kb. 800 bp méretig alkalmazható megbízhatóan, a vizsgálathoz csak az ITS1 régiót szaporítottam fel az ITS1-ITS2 primer pár segítségével, amelynek eredményeképpen három különböző típusú PCR-terméket kaptam (**11. ábra**):

- (i) kb. 440bp-os termék a CBS 1171 típusörzs, az S288c laborörzs, a Badacsony1 borélesztő és 11 hártvaképző borélesztő törzs esetében;
- (ii) kb. 410 bp-os termék egy hártvaképző borélesztő (B3) törzs esetében;
- (iii) kettős PCR termék (440 bp + 410 bp) 14 hártvaképző borélesztő törzs esetében.



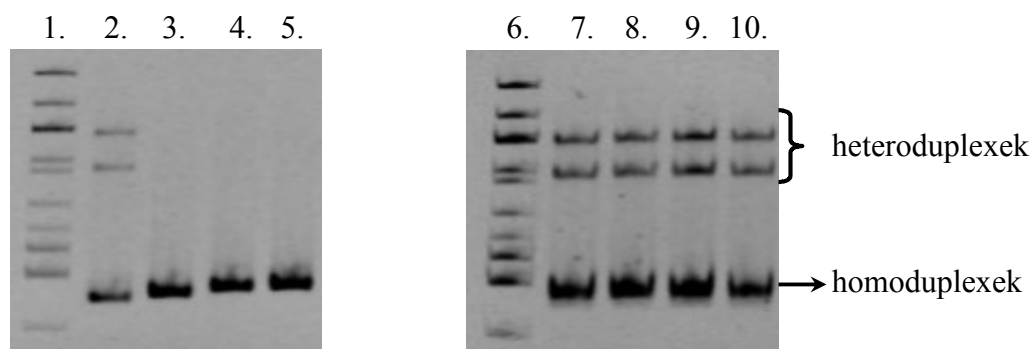
11. ábra: Az ITS1 régió amplifikálásával kapott PCR termékek típusai

1. Marker (100 bp létra), 2. B1*, 3. B3*, 4. B4*

*: hártvaképző borélesztők

Egyes törzsek esetében az ITS1-ITS2 primer-párt alkalmazva kettős PCR-terméket kaptam, ami azt mutatja, hogy ezek a törzsek eltérő hosszúságú rDNS allélt hordoznak. Ennek további vizsgálatához a PCR-termékek denaturációja után, azok ön-renaturációját végeztem el, majd a termékeket

poliakrilamid gélen elválasztottam (**12. ábra**). Az eredmények alapján a törzseket két nagy csoportba (I. és II. csoport) tudtam sorolni (**6. táblázat**). A 26 hártyaképző borélesztő közül 22 polimorf rDNS-sel rendelkezett, mivel ezeknél heteroduplex keletkezett. A B8, a 02/62.1 és a 02/62.2 hártyaképző törzsek esetében csak nagyon halvány heteroduplex képződést lehetett megfigyelni, ami az egyes rDNS típusok eltérő előfordulás arányára utal.

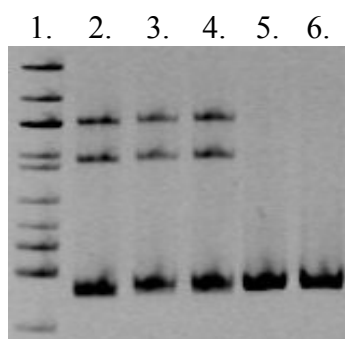


12. ábra: Hártyaképző borélesztő törzsek ön-renaturációja

1. Marker (100 bp létra), 2. B1*, 3. B3*, 4. B4*, 5. B5*, 6. Marker (100bp létra), 7. M2.1*, 8. M2.2*, 9. M4.1*, 10. M4.2*

*: hártyaképző borélesztők

A továbbiakban az I-es csoportba tartozó törzsek hasonlóságát vizsgáltam, amihez a törzsek PCR-termékeit egymással kevertem, majd vizsgáltam a homo- illetve heteroduplex képződést. A PCR termékek méretén és számán alapulva (**11. ábra**) a B3 és a B4 törzset választottam kontroll törzsnek. A B3 törzs rDNS-ével a hártyaképző törzsek mindegyikének rDNS-e heteroduplexet képzett (**13. ábra**), míg a B4 törzs esetében homoduplex képződés volt csak megfigyelhető.



13. ábra: Hártyaképző borélesztő törzsek rDNS ITS1 régiójának heteroduplex analízise.

1. Marker (100 bp létra), 2. B3*-B4*, 3. B3*-B5*, 4. B3*-B22*, 5. B4*-B5*, 6. B4*-B22*

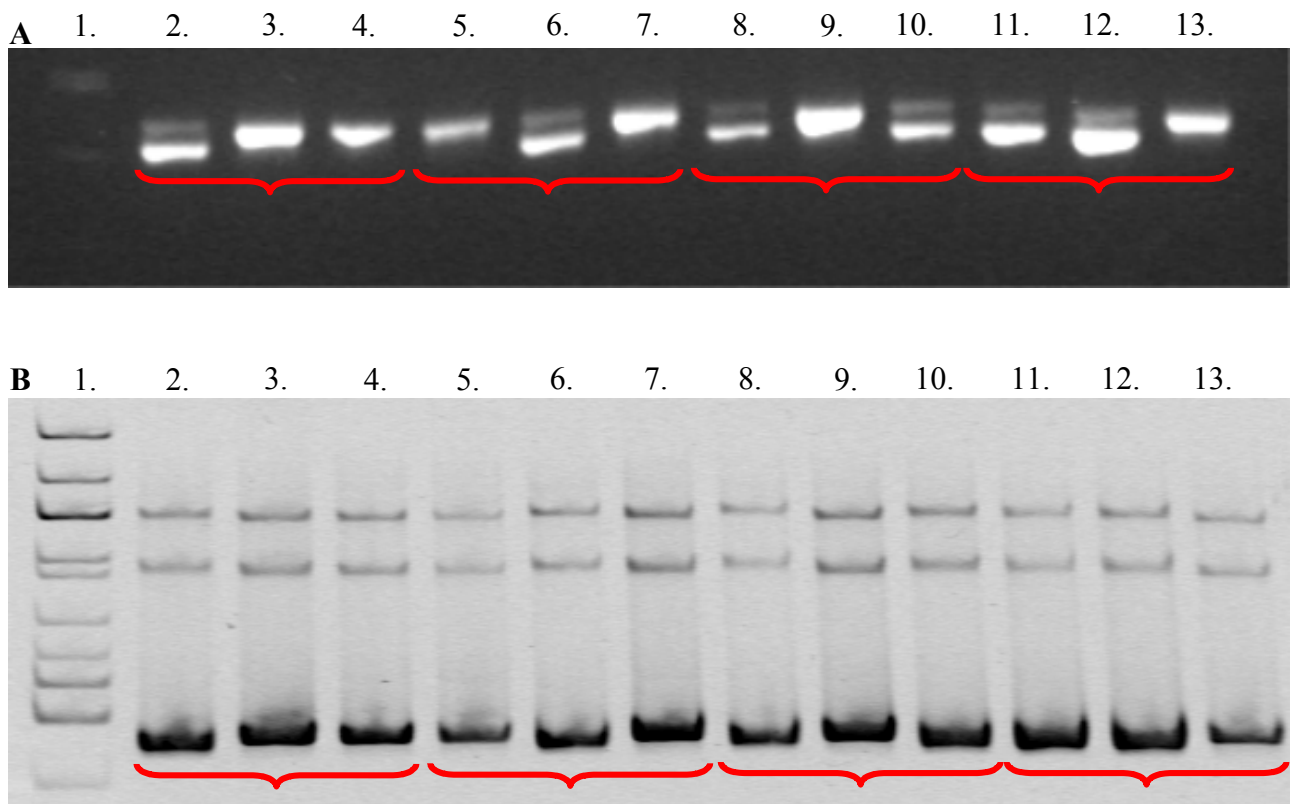
*: hártyaképző borélesztők

Az analízis alapján a **6. táblázat** I. csoportját tovább lehetett bontani. A B3 hártvaképző élesztő – amely egyértelműen elkülönült az rDNS RFLP analízise során a többi hártvaképző élesztőtől – heterológ rDNS-sel rendelkezik (I.a csoport), míg a többi három hártvaképző homológ erre a szekvenciára nézve (I.b csoport).

6. táblázat: Hártvaképző borélesztő törzsek ITS1 régiójának polimorf jellege heteroduplex analízis alapján

I csoport: Nem polimorf ITS1 régió		II csoport: Polimorf ITS1 régió
a) B3	b) B4, B5, B22	B1, B8, B16, TD01.1, TD01.2, TD03, TD04, TD05, M2.1, M2.2, M4.1, M4.2, M7.1, M7.2, M10, M21, M17.1, M17.2, M12.1, M12.2, 02/62.1, 02/62.1

A diploid TD04 törzsből előállított haploidok esetében az rDNS szegregálódását vizsgálva (**14. ábra (A)**), a haploidok fele (52 %) csak a molekuláris adatbankban megtalálható S288c *S. cerevisiae* fajra jellemző PCR-terméket adta (440 bp-os PCR termék), míg a haploidok másik felében (48 %) mindkét típusú rDNS (440 bp + 410 bp dupla PCR termék) megtalálható volt, ami azt jelzi, hogy a kétféle rDNS típus egyetlen kromoszómán, a XII-es kromoszómán fordul elő kombinációban. A felszaporított PCR-termékek ön-renaturációjának vizsgálata (**14. ábra (B)**) során azonban az összes haploidnál heteroduplex keletkezett, ami azt mutatja, hogy az egyetlen PCR terméket eredményező haploidokban is kétféle rDNS allél volt megtalálható.



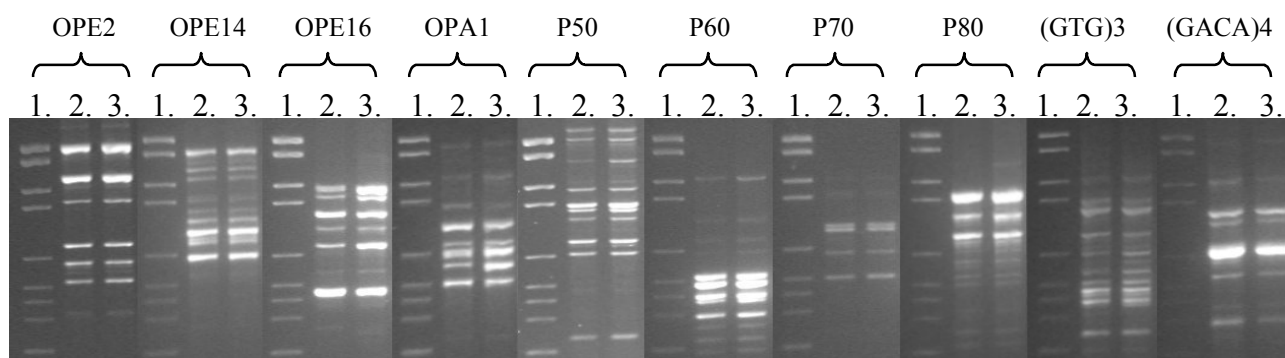
14. ábra: Az rDNS szegregációjának vizsgálata a TD04 törzs esetében (3 túlélő spóra aszkuszonként) A/ PCR-termék B/ PCR-termékek ön-renaturációja. Az egy aszkuszból származó haploidokat piros kapcsos-zárójellel jelöltem

1. Marker (100bp-os létra), 2. 4a*, 3. 4b*, 4. 4c*, 5. 5a*, 6. 5b*, 7. 5c*, 8. 6a*, 9. 6b*, 10. 6c*, 11. 11a*, 12. 11b*, 13. 11c*

*: hártýaképző borélesztők

5.5. A hártýaképző borélesztők RAPD analízise

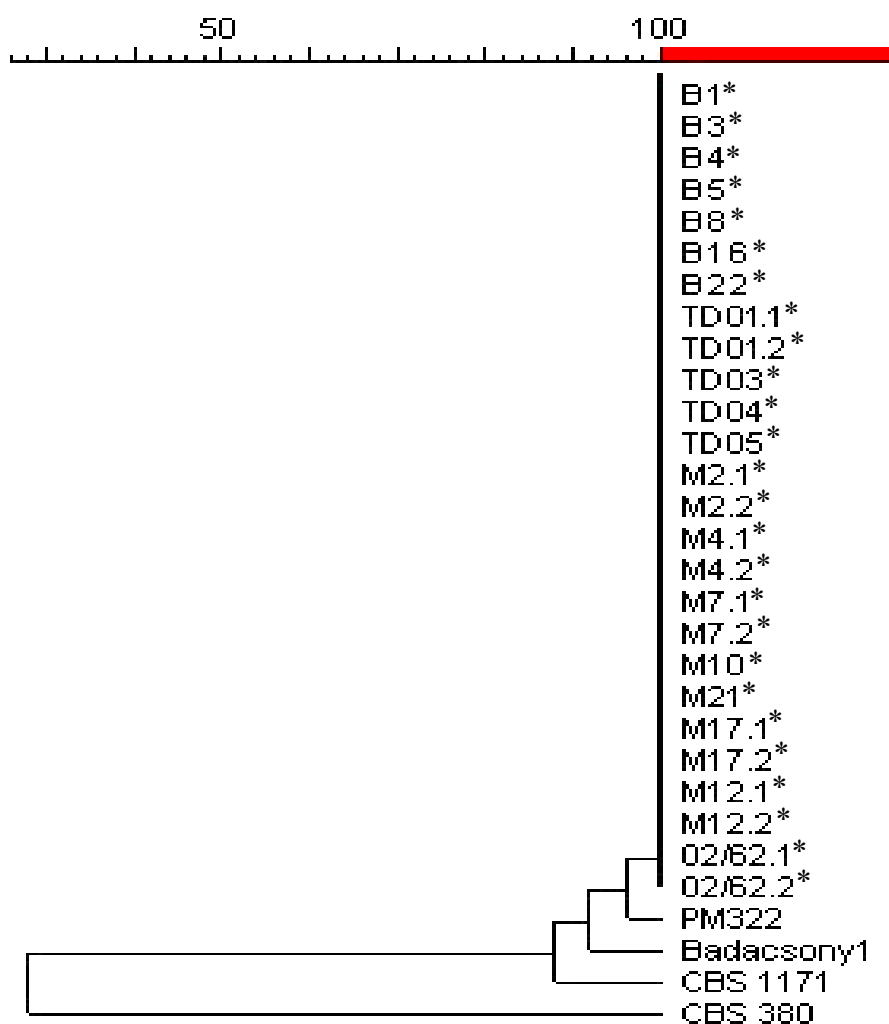
A hártýaképző élesztőgombák törzs szintű összehasonlítása illetve elkülönítése érdekében a hártýaképzők RAPD analízisét különböző GC% tartalmú, 10 nukleotid hosszúságú RAPD primerekkel, valamint a (GTG)₃-as és a (GACA)₄-es mikroszatellit primerekkel végeztem el. A **15. ábrán** a különböző primerekkel kapott PCR mintázatra látható példa. Valamennyi vizsgált hártýaképző törzs nagyfokú (92 %-os) hasonlóságot mutatott a *S. cerevisiae* típustörzzsel (**16. ábra**), egymással pedig 100 %-ban megegyező mintázatot adtak, valamennyi RAPD primer esetében.



15. ábra: Hártyaképző borélesztő törzsek különböző primerekkel kapott RAPD mintázata

1. Marker (VI. Boehringer), 2. B1*, 3. B3*

*: hártaképző borélesztők



16. ábra: Hártyaképző borélesztők kombinált RAPD dendogramja. Kontrollként a *S. cerevisiae* típustörzset (CBS 1171) és *S. bayanus* típustörzset (CBS 380), valamint két borélesztő törzset (PM 322 és Badacsony1) alkalmazva. A hártaképző törzseket * jelöli.

5.6. A hártýaképző borélesztők cukorerjesztési spektrumának meghatározása

Megvizsgáltam, hogy a tokaji hártýaképző törzsek cukorerjesztési képességük alapján besorolhatóak-e a Martinez és mtsi. (1995) által a flor élesztők cukorerjesztési spektruma szerint meghatározott fiziológiai változatokba. A hártýaképző élesztők többsége (20 törzs) a *beticus* változatba tartozik (7. táblázat). A *S. cerevisiae cheresiensis* változatába 4 hártýaképző, míg a *montuliensis* illetve a *rouxii* változatba 1-1 hártýaképző törzs sorolható. A kontrollként kiválasztott borélesztő törzsek közül (Badacsonyl és PM 322) meglepően csak a Badacsonyl jelzésű törzs mutatta a *Saccharomyces cerevisiae* típustörzsrre jellemző erjesztési mintázatot, míg a PM 322-es jelzésű törzs a *cheresiensis* változatba tartozónak bizonyult.

7. táblázat: A hártýaképző borélesztők besorolása különböző fiziológiai változatokba

Törzsek	Szénhidrát fermentáció				<i>S. cerevisiae</i> változat
	glükóz	szacharóz	maltóz	galaktóz	
Badacsonyl (kontroll)	+	+	+	+	<i>S. cerevisiae</i>
B4, B8, B16, B22, TD01.1, TD01.2, TD03, TD05, M2.1, M2.2, M4.1, M4.2, M7.1, M7.2, M10, M21, M17.1, M17.2, M12.1, M12.2	+	+	-	-	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>beticus</i>
TD04	+	-	-	-	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>montuliensis</i>
B1, B5, 02/62.1, 02/62.2, PM 322	+	+	-	+	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cheresiensis</i>
B3	+	-	-	+	<i>S. cerevisiae</i> var. <i>rouxii</i>

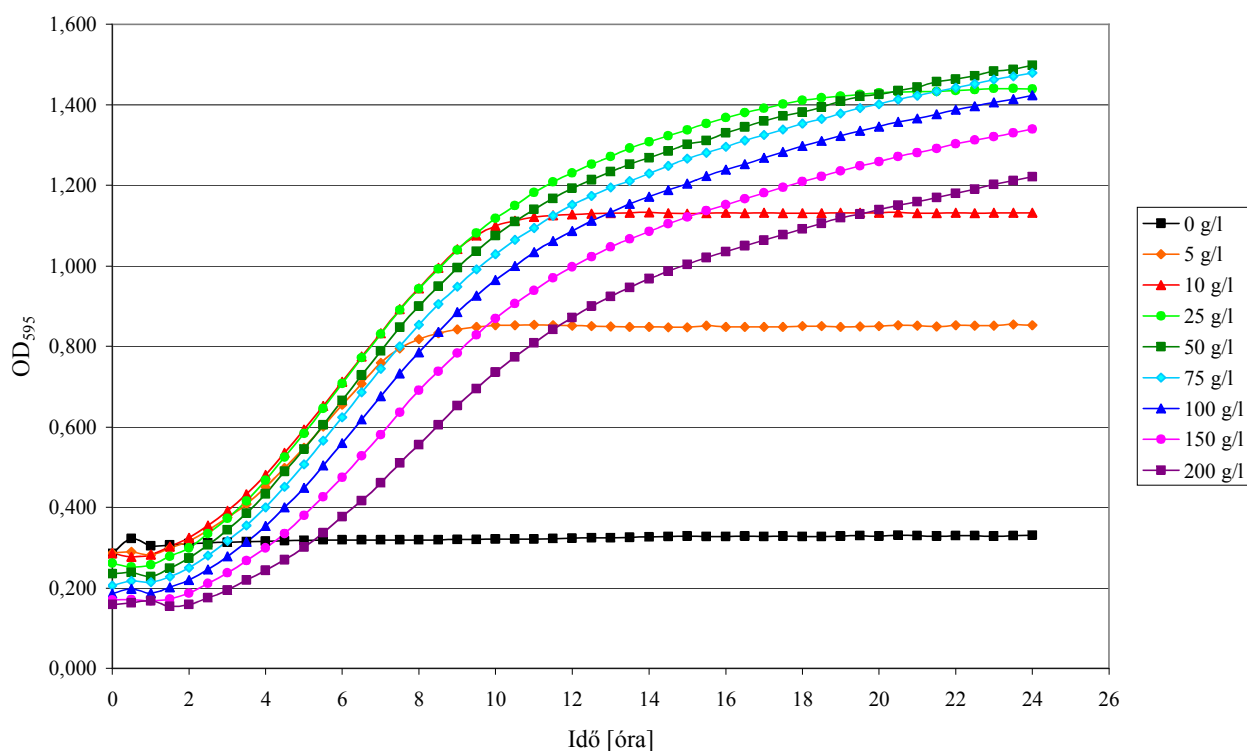
5.7. A hártýaképző borélesztők szaporodását és hártýaképzését befolyásoló környezeti tényezők jellemzése

A 4.5.9.-es és a 4.5.10.-es fejezetben leírt szaporodási, illetve hártýaképzési vizsgálatokat egymással párhuzamosan végeztem. A szaporodási vizsgálatoknál alkalmazott minimál tápközeg nem bizonyult alkalmasnak a hártýaképzés kivitelezésére, ugyanis egy napos inkubáció után a

sejtek összekapcsolódás nélkül (hártaképzés nélkül) a tápközeg felszínén lebegtek. Ez az „ál-hártaképzés” megakadályozta a valódi hártaképzés észlelését, ezért a hártaképzés vizsgálatára YEP tápközeget használtam a megfelelő komponensekkel kiegészítve.

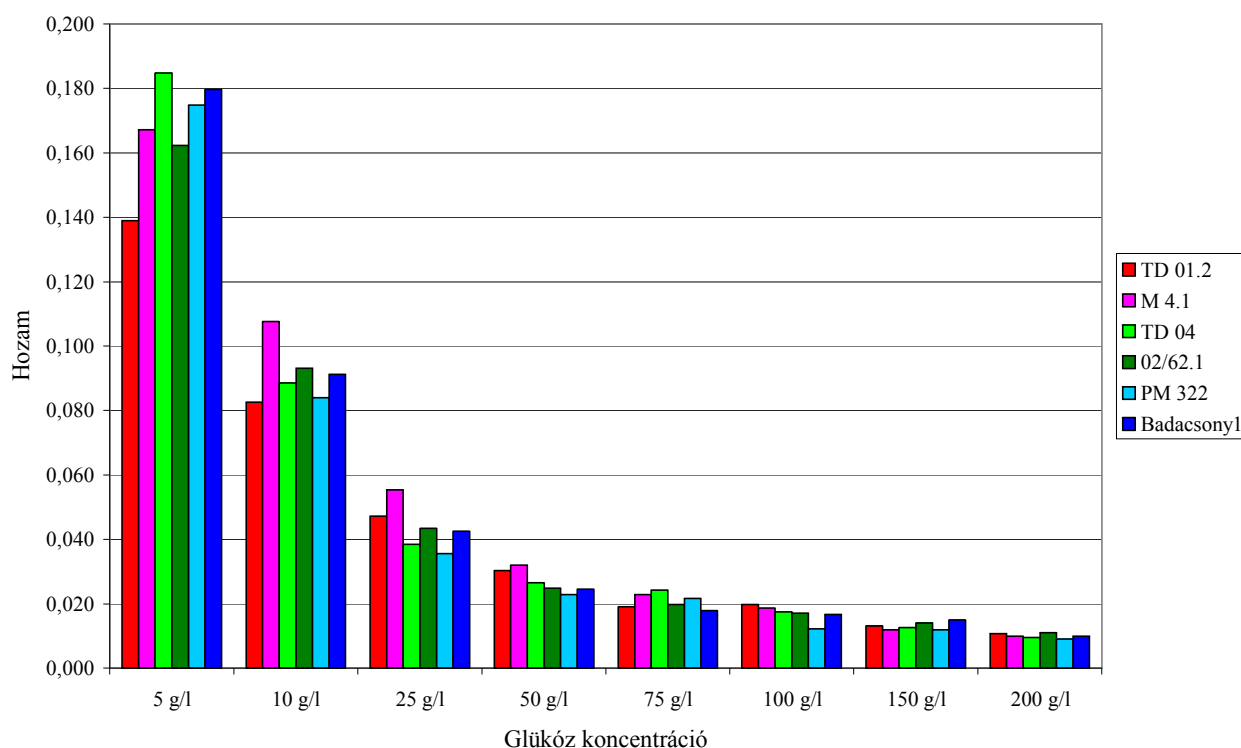
5.7.1. Glükóz koncentráció hatása a szaporodásra és a hártaképzésre

A vizsgálat során két száraz szamorodniból (TD01.2 és M4.1) és két édes szamorodniból (TD04 és 02/62.1) származó hártaképző törzs, valamint két nem hártaképző borélesztő (PM 322 és Badacsony1) szaporodását hasonlítottam össze. A vizsgált törzsek között nem találtam lényeges különbséget. A különböző koncentrációknál kapott tipikus szaporodási görbékre a **17. ábrán** látható példa. A törzsek szaporodása rövid, 1-2 órás lag fázis után beindult. Kis glükóz koncentrációk esetén (5 g/l illetve 10 g/l) az élesztők hamar felhasználták a rendelkezésre álló szénforrásokat (kb. 8 óra illetve 11 óra), ami után beállt a stacioner fázis. 25 g/l-es glükóz koncentráció esetében a stacioner fázis a tenyésztés 20-22. órája körül állt be. Ennél nagyobb koncentrációnál a törzsek a vizsgálat 24 órája alatt nem érték el a stacioner fázist, valamint a szaporodási görbék lefutásából látható, hogy a glükóz koncentráció emelésével a szaporodás sebessége és glükóz felhasználás hatékonysága csökkent.



17. ábra: A TD04 törzs szaporodási görbéi különböző glükóz koncentrációk (0 g/l → 200 g/l) esetében. A szaporodás jellemzése a sejtszuszpenziók OD értékeinek mérésével történt.

A borélesztők hozamát meghatározva megerősítést nyert a glükóz szaporodásra gyakorolt gátló hatása (glükóz represszió) (**18. ábra**). A legnagyobb hozamot az 5 g/l glükóz alkalmazása esetén kaptam. A glükóz koncentráció megduplázása a hozam felére csökkenését vonta maga után. A koncentráció további emelésével a hozam fokozatosan a minimális 0,01-es szintre csökkent. Nem találtam különbséget a száraz illetve az édes szamorodniból származó hártaképzők, valamint a nem hártaképző borélesztők hozama között.



18. ábra: Borélesztő törzsek sejthozama különböző glükóz koncentrációk (0 g/l → 200 g/l) esetében

A glükóz hártaképzésre gyakorolt hatását vizsgálva különbségek mutatkoztak a száraz, illetve az édes szamorodniból izolált hártaképző élesztők esetében (**8. táblázat**). A hártaképződés beindulása az édes szamorodniból származó törzs esetében érzékenyebb volt a glükóz koncentráció emelésére. A beoltáshoz használt sejttömeg glükóz-mentes táptalajon is képes volt hártát képezni. Ebben az esetben az egy hetes inkubáció után a felszint borító hártá méretében növekedést volt tapasztalható, ami a táptalajban lévő élesztőkivonat és az esetlegesen elhalt sejtek autolízise során kiszabadult tápanyagok hasznosítására vezethető vissza. Kis glükóz tartalom esetében, 75 g/l-es koncentrációig a száraz szamorodniból származó törzs 3-5 nappal korábban képzett hártát, mint az édes szamorodniból származó törzs. E koncentráció felett a hártaképződés beindulása

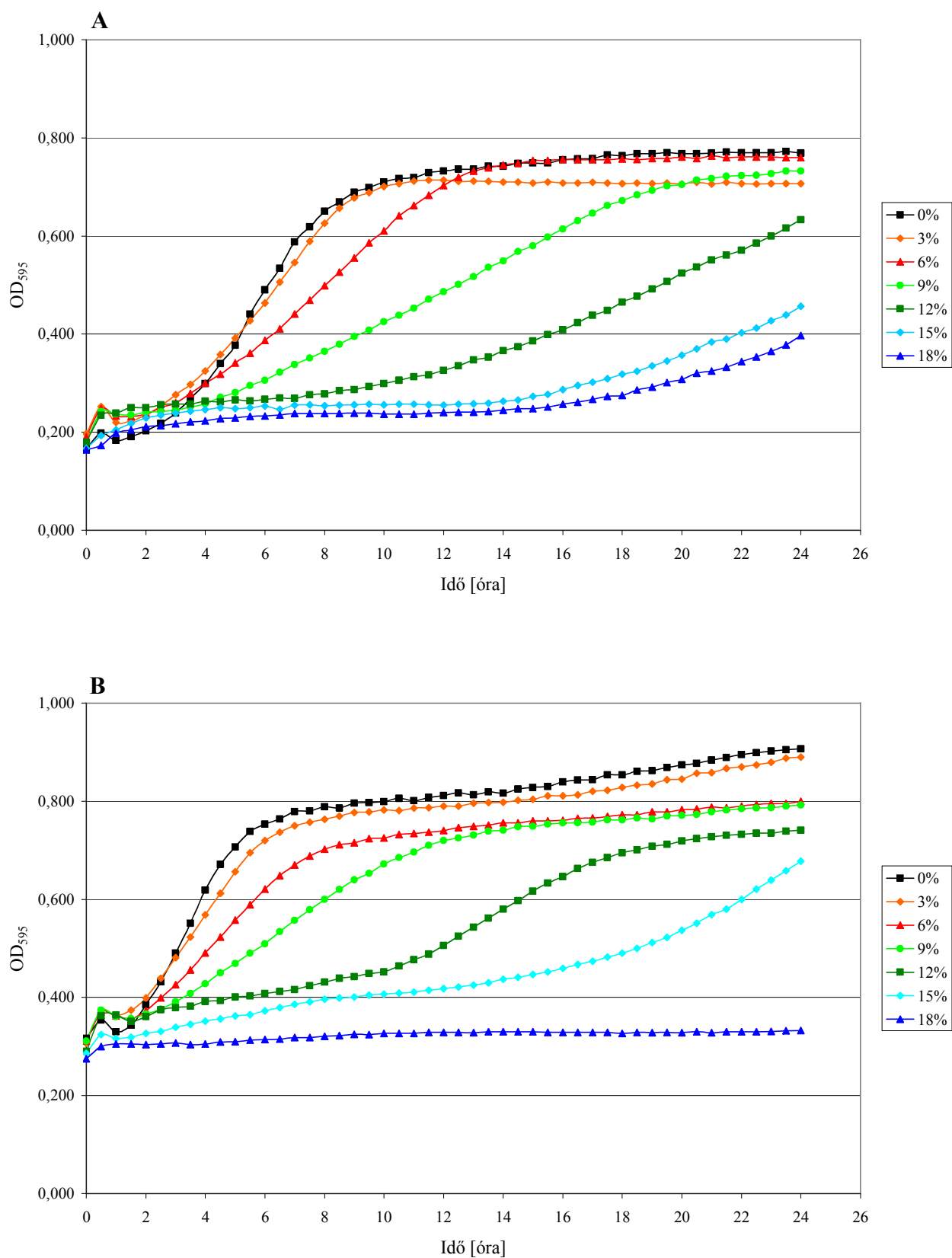
megközelítőleg kiegyenlítődik, illetve nagyon kis mértékben az édes borból származó törzs került előtérbe.

8. táblázat: A glükóz koncentráció hatása a száraz szamorodniból (TD01.2) és az édes szamorodniból (TD04) izolált törzsek hártýaképzésre

Kiindulási glükóz koncentráció a YEP táplevesben	Hártýaképződés beindulása	
	TD01.2	TD04
0 g/l	1. nap	1. nap
5 g/l	1. nap	1. nap
10 g/l	1. nap	4. nap
25 g/l	1. nap	6. nap
50 g/l	3. nap	8. nap
75 g/l	8. nap	13. nap
100 g/l	13. nap	12. nap
150 g/l	22. nap	21. nap
200 g/l	24. nap	22. nap

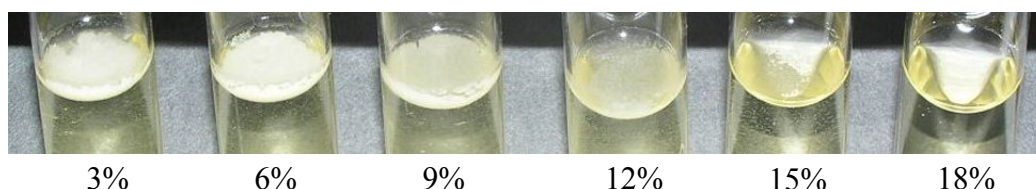
5.7.2. Etanol koncentráció hatása a szaporodásra és a hártýaképzésre

Az etanol a fő szénforrás a hártýaképzés során, azonban erős toxikus hatása miatt a hártýaképző élesztőknek jó etanol-toleranciával kell rendelkezniük. Ennek vizsgálatát tűztem ki célul a tokaji hártýaképző élesztők esetében. Az etanol erős hatást gyakorolt a vizsgált törzsek szaporodására (**19. ábra (A)**). 3 %-os koncentráció felett az etanol a szaporodás lassulását eredményezte. 12 % etanol tartalom esetében a lag fázis erősen kitolódott a tenyésztés 8-11. órájáig, törzstől függően. Ezen koncentráció felett a szaporodás csak 16 óra elteltével volt tapasztalható, ami az etanol elpárolgása következtében kialakuló kisebb koncentrációnak tulajdonítható. Ez alól egyedül a Badacsony1 jelzésű törzs képez kivételt (**19. ábra (B)**), amely esetében a szaporodás még 24 óra elteltével sem indult be a 18 % etanol tartalmú tápközegben, feltételezhetően a nagy etanol koncentráció toxikus hatásának köszönhetően.



19. ábra: A TD04 hártaképző (A) és a Badacsony1 nem-hártaképző (B) törzsek szaporodási görbéi különböző etanol koncentrációk (0% → 18%) esetében. A szaporodás jellemzése a sejtszuszpenziók OD értékeinek mérésével történt.

Az etanol koncentráció a hártya fejlődésére is hatással volt (**20. ábra, 9. táblázat**). Hozzáadott etanol nélkül a jó hártyaképzés a tápközegben jelenlévő 5 g/l glükóz kieresztéséből keletkező etanol jelenlétével magyarázható. 9 % etanol tartalomig a hártyaképzés gyorsan lezajlott, és minden esetben a teljes felszint beborító, stabil, erős hártya alakult ki. 12 %-nál nagyobb etanol koncentrációnál a hártyaképződés már lassabb, és gyengébb, ami az etanol szaporodásra gyakorolt gátló hatásával magyarázható. 18 % etanol tartalomnál hártyaképzést már nem tapasztaltam.



20. ábra: A TD04 törzs hártyaképzése különböző etanol koncentrációk (0% → 18%) esetében YEP(D) táplevesben a 3. napon

9. táblázat: Az etanol koncentráció hatása a TD04 törzs hártyaképzésére YEP(D) táplevesben

Hozzáadott etanol koncentráció	1. nap	2. nap	3. nap	6. nap
0 %	+	+++	+++	+++
3 %	+	++	+++	+++
6 %	++	+++	+++	+++
9 %	++	+++	+++	+++
12 %	+	++	++	+++
15 %	(+)	+	+	++
16 %	-	(+)	(+)	+
17 %	-	(+)	(+)	+
18 %	-	-	-	-

Hártyaképződés erőssége: -: nincs hártyaképzés; (+): a tápleves felszínén néhány sejt hártyává kezd összeállni; +: a tápleves felszínének 1/3-át élesztőhártya borítja; ++: a tápleves felszínének 2/3-át élesztőhártya borítja; +++: a tápleves felszínének egészét élesztőhártya borítja

5.7.3. pH hatása a szaporodásra és a hártyaképzésre

Az *Saccharomyces sensu stricto* csoport számára az optimális pH tartomány általában az 5,0-5,5 értékek közé esik, a must, illetve a kieresztett borok pH-ja viszont ennél kisebb, 2,8-3,7 között változik

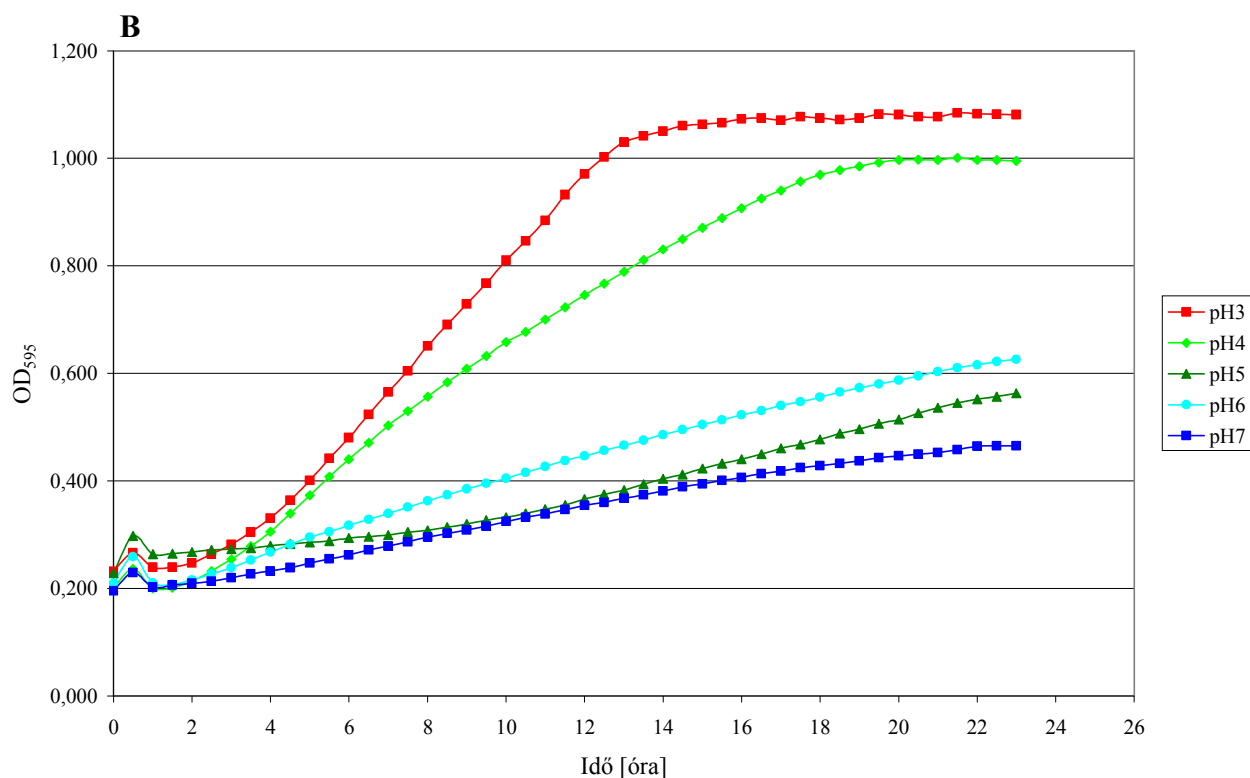
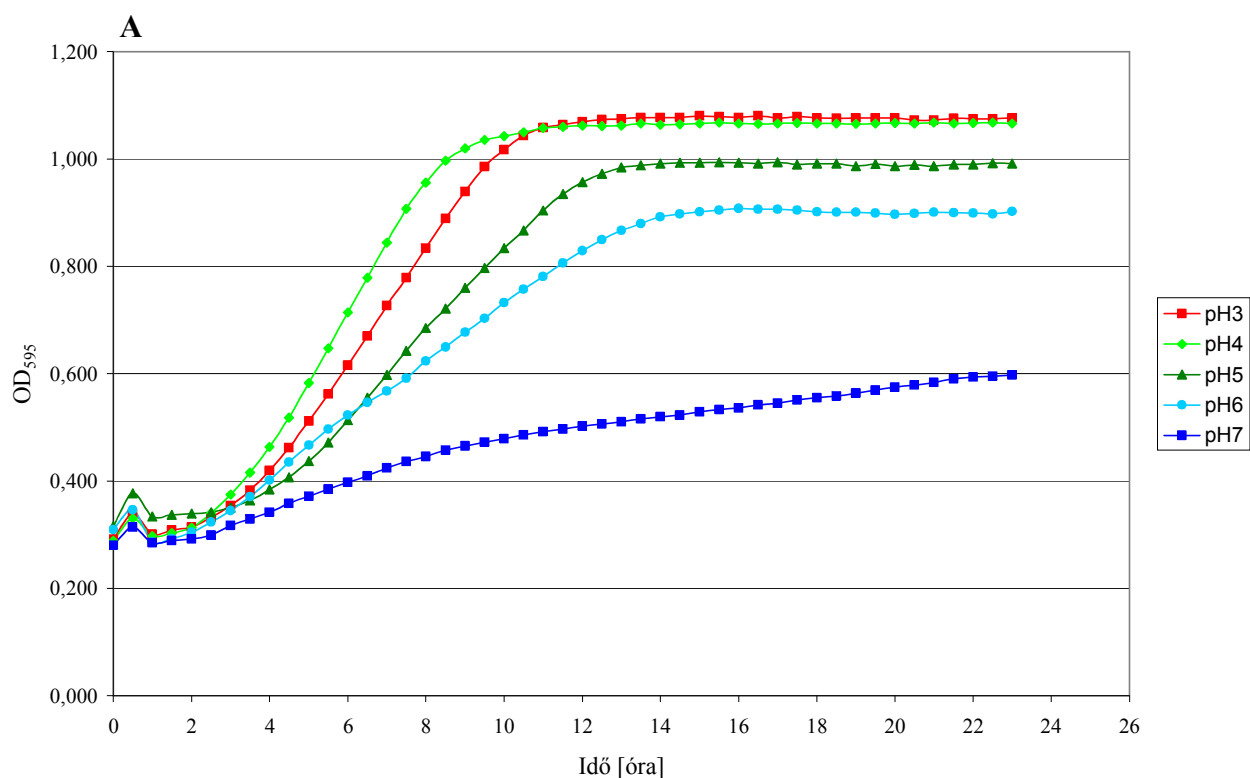
(Kállay, 1998). A hártýaképző borélesztőknek ezen értékek mellett kell szaporodniuk, illetve hártýát kialakítaniuk.

Megvizsgáltam a hártýaképző élesztők szaporodásának pH tartományát, illetve optimumát. A vizsgálatok alapján mind a szaporodás, mind a hártýaképzés esetében a 4-es pH volt az optimális (**10. táblázat, 21. ábra (A)**). pH5-ös illetve 6-os értékek esetében a vizsgált törzsek fajlagos szaporodási sebessége csökkent (**22. ábra**), valamint a hártýaképzés ideje kitolódott. 7-es pH-t alkalmazva a törzsek szaporodása jelentősen gátlódott, a TD01.2 törzs szaporodása pedig teljesen gátolt volt. Semleges pH értéknél a sejtek még képesek voltak hártýává összekapcsolódni, de ennél nagyobb pH értéknél hártýaképzésről már nem lehet beszélni. Szaporodási szempontból a pH emelésére a PM 322 jelzésű borélesztő törzs volt a legérzékenyebb (**21. ábra (B)**), a törzs optima pH3 volt, pH5-nél pedig a fajlagos szaporodási sebesség már erősen lecsökkent.

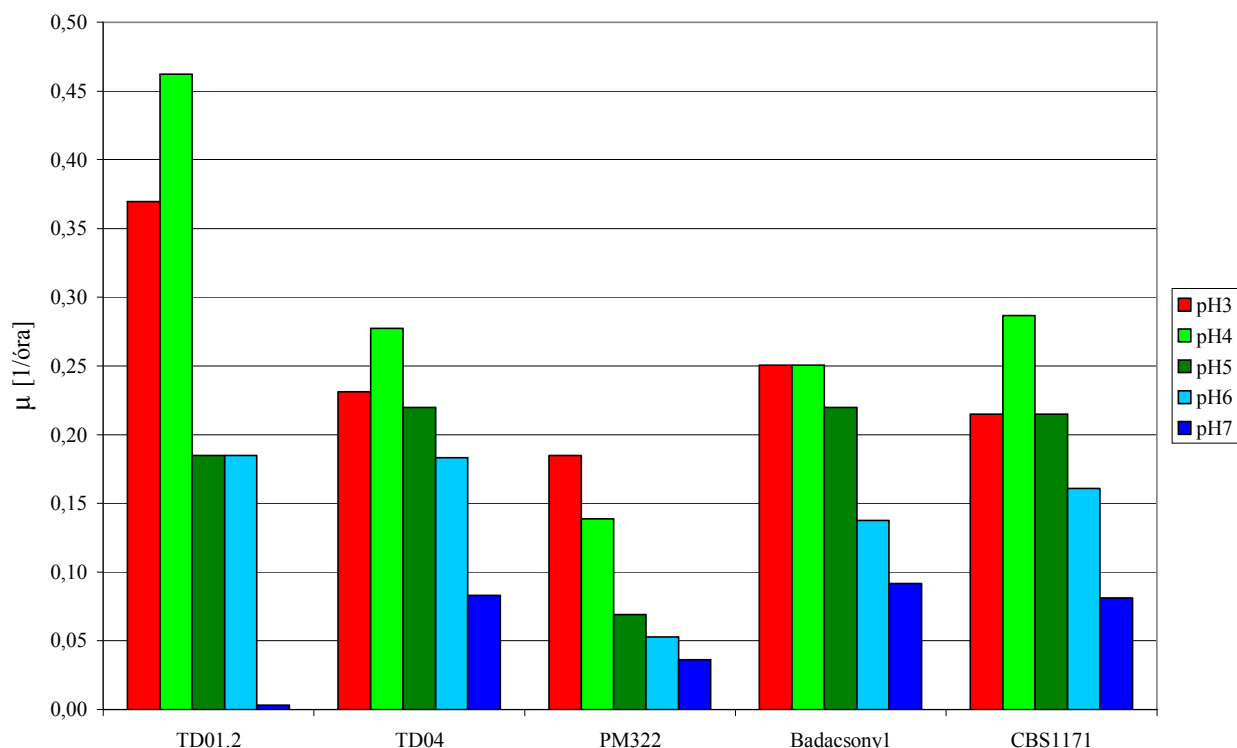
10. táblázat: A pH hatása a TD04 törzs hártýaképzésére YEP(D) táplevesben

pH	1. nap	2. nap	3. nap	6. nap
3	++	++	+++	+++
4	++	+++	+++	+++
5	+	++	++	+++
6	+	+	+	++
7	-	-	(+)	+
8	-	-	(+)	(+)
9	-	-	(+)	(+)

Hártýaképződés erőssége: -: nincs hártýaképzés; (+): a tápleves felszínén néhány sejt hártýává kezd összeállni; +: a tápleves felszínének 1/3-át élesztőhártýa borítja; ++: a tápleves felszínének 2/3-át élesztőhártýa borítja; +++: a tápleves felszínének egészét élesztőhártýa borítja



21. ábra: A TD04 hártvaképző (A) és a PM322 nem-hártvaképző (B) törzsek szaporodási görbéi különböző pH értékek esetében. A szaporodás jellemzése a sejtszuszpenziók OD értékeinek mérésével történt.



22. ábra: A hártvaképző (TD01.2 és TD 04) és nem-hártvaképző (PM 322 és Badacsonyl) borélesztő törzsek fajlagos szaporodási sebességeinek (μ) változása a pH függvényében, összehasonlítva a *S. cerevisiae* típustörzsszel

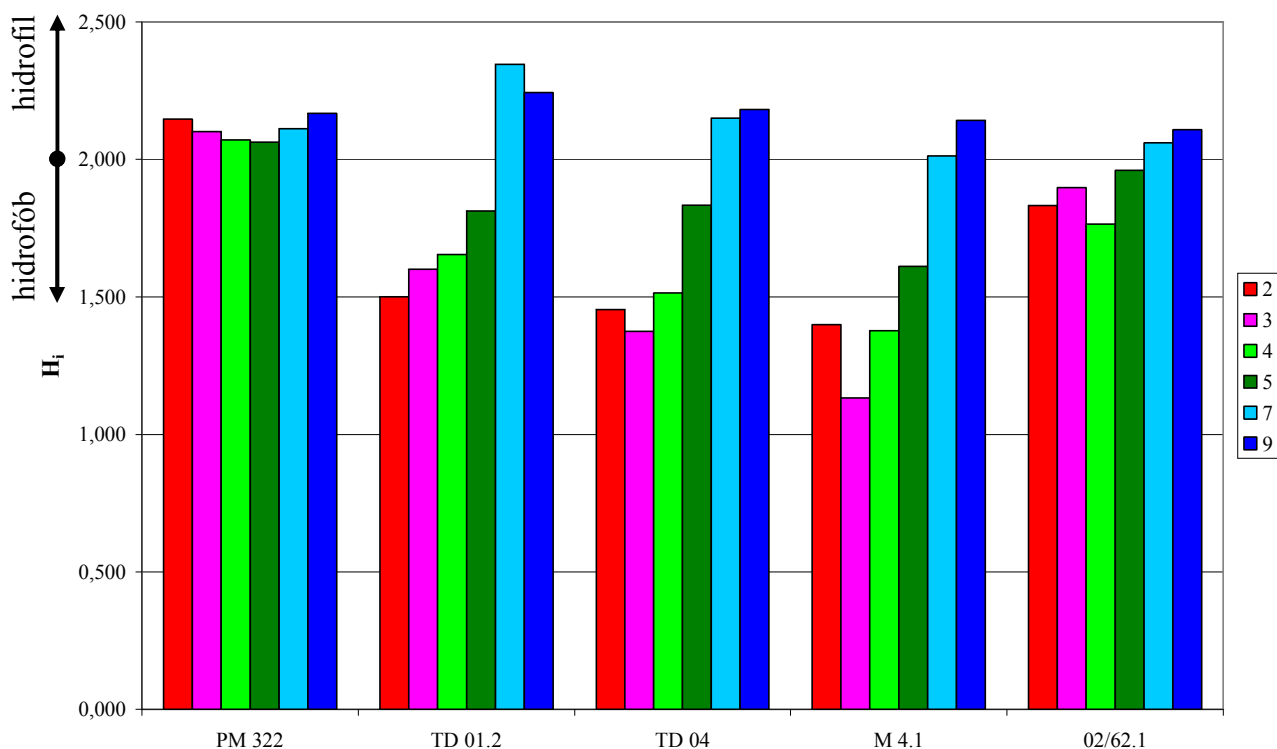
5.8. Sejtfelületi hidrofóbicitás vizsgálata

Számos közlemény foglalkozik a hidrofóbicitás meghatározásával, azonban nincs egységes leírás sem az alkalmazott oldószer mennyiségéről, sem a keverés idejéről, ezért először ezen paraméterek optimalizálását végeztem el. Oldószer mennyiség hatásának vizsgálatakor a hidrofóbicitás értékében csak a 10 %-nál kisebb oldószer mennyiséggel tapasztaltam csökkenést, ezért a méréseimhez minden esetben a 20 %-os oldószer koncentrációt alkalmaztam. A keverési idő hatását vizsgálva a nem tapasztaltam eltérést, egyedül a 10 másodperces keverés nem bizonyult elégségesnek, ezért vizsgálataimhoz a 30 másodperces vortexelést választottam.

5.8.1. A pH hatása a hidrofóbicitásra

A hártvaképző élesztők szaporodása és hártvaképzése a savas pH tartományban optimális, elsőként ezért a pH hatását vizsgáltam a sejtfelszín hidrofóbicitására (**23. ábra**). A vizsgálathoz a stacioner sejteket különböző pH-ra beállított K-foszfát pufferben szuszpendáltam, majd apoláros oldat

hozzáadása és erőteljes keverés után néztem a sejtek megoszlását a két fázis között. A hártaképző sejtek felszíne a savas pH tartományban erősen hidrofóbnak bizonyult. Semleges, illetve lúgos pH értékek esetében a felszín hidrofíllé változott. A legkisebb hidrofóbicitási értékkel a 02/62.1 hártaképző törzs rendelkezett, azonban ennél a törzsnél is kismértékben nőtt a hidrofíll jelleg a pH érték emelésével, mint a többi hártaképző esetében. A kontroll borélesztő törzs felszíne minden vizsgált pH értéknél hidrofílnak bizonyult. A TD04 diploid törzs meiotikus szegregánsainak hidrofóbicitását vizsgálva megállapítottam, hogy a haploidok sejtfelszíne a diploid törzshöz hasonlóan nagyon hidrofób.

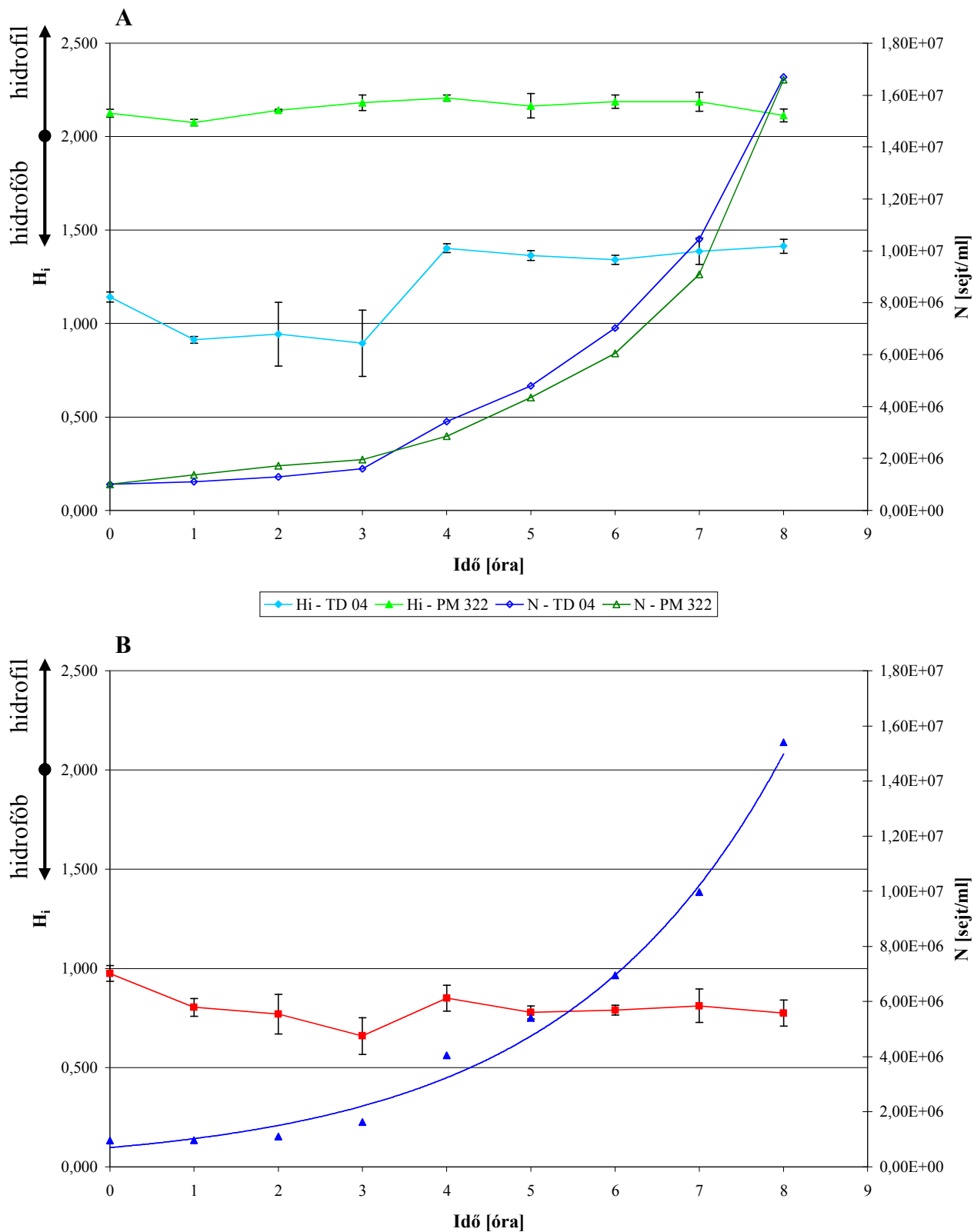


23. ábra: A pH hatása a borélesztők hidrofóbicitására

H_i : Hidrofóbicitási index

5.8.2. A hidrofóbicitás változása a szaporodás során

A hártaképzés legkedvezőbb esetben is 24 órás inkubálás után, tehát a sejtek stacioner fázisában indul. A hártaképző törzsek stacioner fázisú sejtei erősen hidrofóbnak bizonyultak. Annak érdekében, hogy az exponenciális fázisban lévő sejtek hidrofóbicitását vizsgálhassam, a szaporodás első 8 órájában követtem nyomon a változást (**24. (A) ábra**). A szaporodás folyamán a hidrofóbicitás lényegesen nem változott. A hártaképző törzs esetében a hidrofóbicitás értékében egy kismértékű csökkenés volt megfigyelhető a gyorsulási fázisban, ezután a hidrofóbicitás értéke már nem változott, beállt a törzsre jellemző hidrofóbicitási érték.



24. ábra: A sejtfelszíni hidrofóbicitás alakulása a szaporodás folyamán.

A/ A TD04 hártaképző és PM 322 planktonikus borélesztő törzs szaporodása és hidrofóbicitása komplett YEPD táplevesben B/ A TD04 hártaképző borélesztő szaporodása és hidrofóbicitása pH 3,3 értékű hártaképző YEP(D) táplevesben

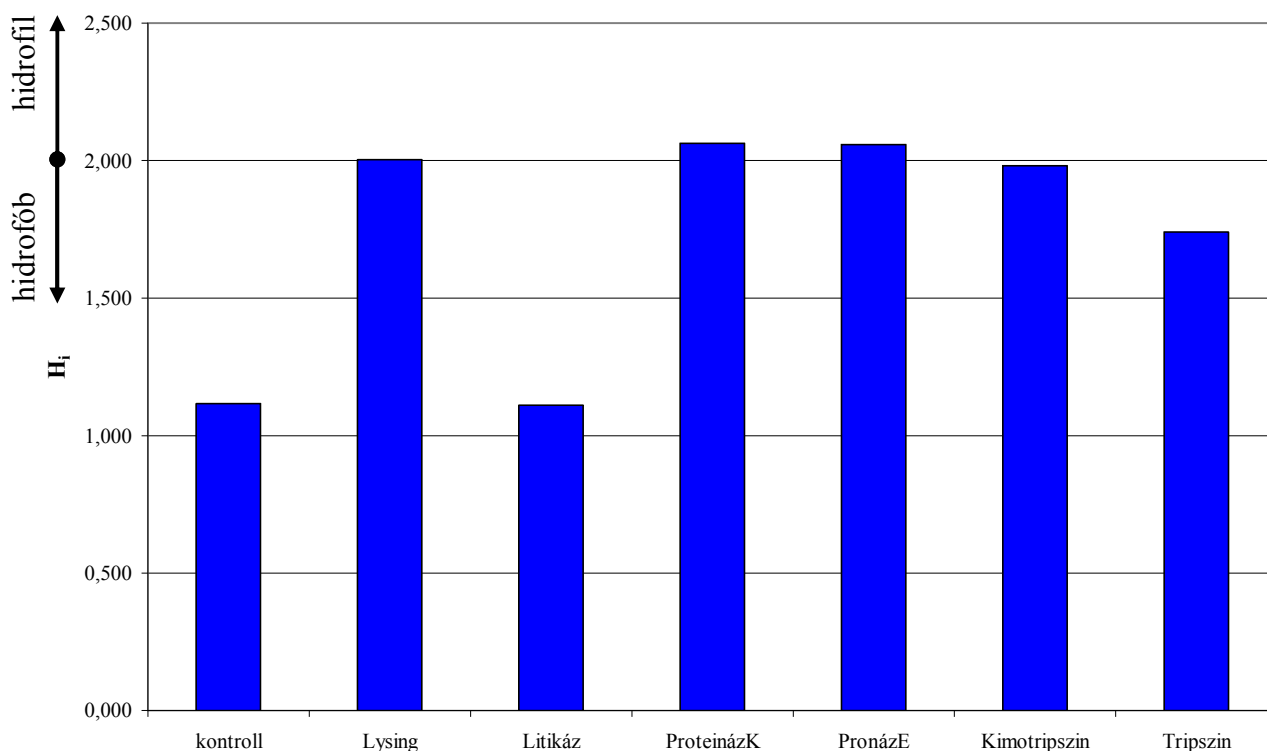
Hi: Hidrofóbicitási index; N: Sejt koncentráció

A tenyésztés körülményeit összehasonlítva elmondható, hogy a tápközegek eltérő összetétele [YEPD és YEP(D)] illetve pH értéke (24. *ábra*) nem volt lényeges hatással a hidrofóbicitás alakulására. A hártaképző táplevesben való tenyésztés esetén a beoltáskori hidrofóbicitás kismértékben nőtt, majd a gyorsulási fázisban csökkent, azonban nem érte el a beoltáskori hidrofóbicitási értéket. A hártaképző tápleves esetén nem lehetett a komplett táptalajnál tapasztalt lag fázis utáni hidrofóbicitás csökkenést megfigyelni, aminek következtében a sejtek nagyobb hidrofóbicitással rendelkeztek a komplett táptalajban tenyésztett sejteknél.

5.8.3. Enzimek hatása a hidrofóbicitásra

Valószínű, hogy a flokkulációban résztvevő lektinekhez hasonlóan a hártaképzésben is a sejtfa felületi rétegében lokalizált hidrofób fehérjék játszanak kulcsszerepet. Ennek ellenőrzése érdekében, különböző enzimikus kezelések hatását vizsgáltam a hidrofóbicitás alakulására

Az enzimekkel való kezelés egyértelműen kimutatta, hogy a sejtfa felület hidrofóbicitásáért fehérjék felelősek, mivel a felület hidrofóbicitása erősen csökkent, illetve egyes esetekben hidrofíllé is vált a fehérjebontó és sejtfaoldó enzimek hatására (25. *ábra*).

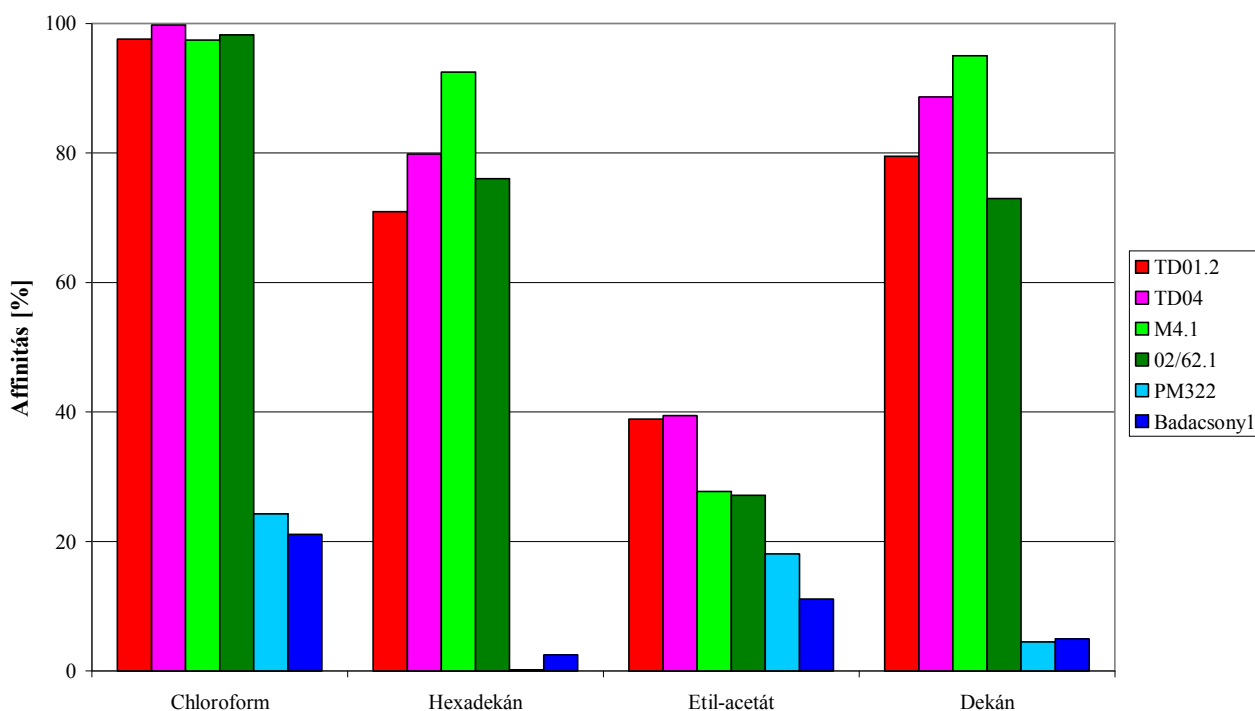


25. ábra: A TD04 hártaképző törzs hidrofóbicitásának változása különböző enzimikus kezelések hatására

H_i: Hidrofóbicitási index

5.8.4. Borélesztők Lewis sav-bázis kölcsönhatásának meghatározása

A borélesztő törzsek elektron donor/elektron akceptor (sav-bázis) tulajdonságának a meghatározását MATS módszer segítségével (4. 5. 12. fejezet) végeztem el, melynek során a sejteket vizes fázisban szuszpendáltam, majd különböző szerves oldószerek hozzáadása és erőteljes keverése után néztem a sejtek megoszlását a két fázis között. A mérésekhez a hexadekán és kloroform, illetve a dekán és etil-acetát oldószer párokat választottam. A hártýaképző törzsek affinitása mind a dekánnal, mind a hexadekánnal szemben nagy (**26. ábra**), ami megerősíti a xilollal kapott eredményeket, miszerint a hártýaképzők sejtei erősen hidrofóbok. Az affinitás értéke a két nem hártýaképző borélesztő esetén 40 % alatt van, tehát hidrofílnak tekinthetők. A vizsgált törzsek mindegyikének nagyobb az affinitása a kloroformmal szemben, mint az etil-acetáttal szemben, ami ezen törzsek elektron donor jellegére utal. A hártýaképző törzsek affinitása kiemelkedően nagy a kloroformmal szemben.



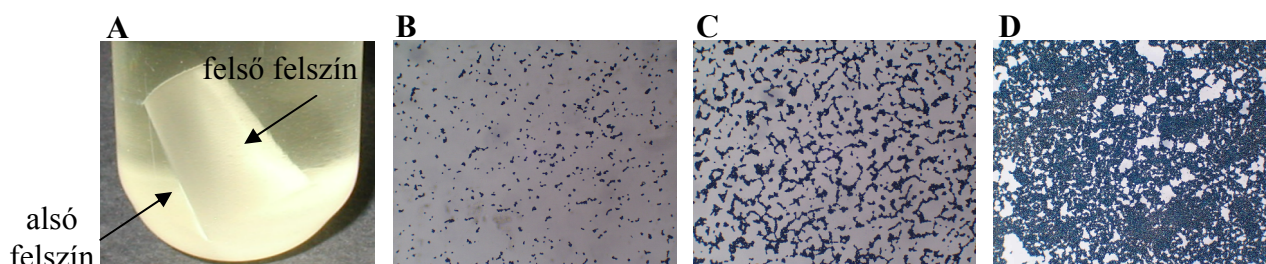
26. ábra: Borélesztők affinitása különböző oldószerekhez

5.9. Az adhéziós képesség és az invazív növekedés vizsgálata

Számos mikroorganizmus képes különböző felszíneken bevonatot képezni, amit biofilmnek hívnak. A baktériumok biofilm képző képességét polisztirolhoz való tapadásuk alapján becsülik meg. Reynolds és Fink (2001) kutatásai szerint a *S. cerevisiae* is képes hozzátapadni polisztirol felülethez. A műanyaghoz rögzült sejtek ismételt mosásra sem távolíthatók el. Emellett számos tanulmány számolt be az élesztők nitrogén limitációra bekövetkező álhifás növekedéséről, amely során az álhifák képesek behatolni a táptalajba (invazív növekedés).

A hártvaképző élesztők a táplevesben rendelkezésre álló glükóz kimerítése után, a hártvaképzés előtt átmenetileg a tápleves aljára lesüllyednek. A TD01.2 és a TD04 hártvaképző törzs hártvaképzését polisztirol petricsészében kivitelezve, a petricsészék alján lévő sejtek vizsgálata alapján elmondható, hogy a lesüllyedt sejtek a polisztirolhoz hozzátapadtak, onnan gyenge vízszugárral mosva nem távolíthatóak el. Ez is megerősíti a sejtek hidrofób jellegét, ugyanis a polisztirolhoz való adhéziót gyakran alkalmazzák a sejt felszíni hidrofóbicitás mérésére (Rosenberg et al., 1980).

A hártvaképző élesztők folyadékban való szaporításakor gyakran megfigyelhető jelenség az élesztősejtek növekedése a kémcső falán, ami szerepet játszhat a sejteknek a folyadékfelszínre való feljutásában. A folyamat ellenőrzéséhez a tenyésztést egy, a folyadékban ferdén elhelyezett fedőlemez jelenlétében végeztem. A tenyésztés különböző fázisaiban a fedőlemezhez tapadt sejteket vizsgálva a fedőlemez alsó felszínén nem találtam rögzült sejteket csak a fedőlemez felső felületén (27. ábra).

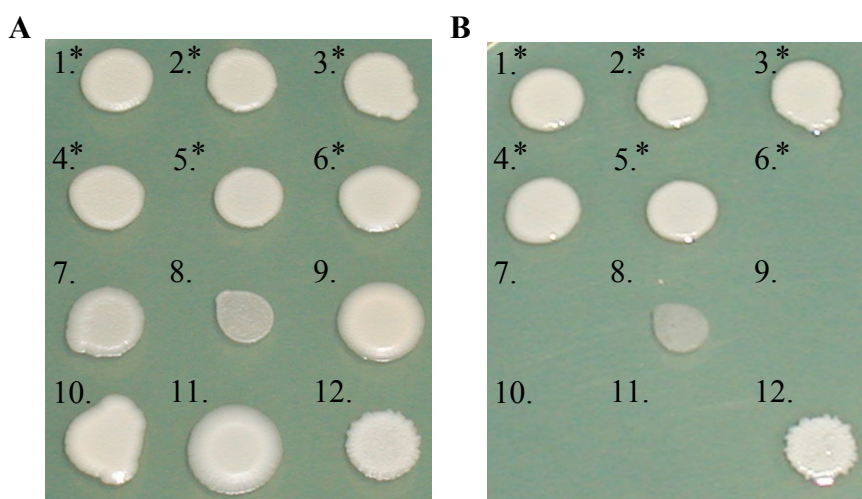


27. ábra: Az üveghez való adhézió kísérleti elrendezése (A), illetve a TD04 törzs adhéziója üveghez B/ 1. nap C/ 2. nap D/ 3. nap

A hártvaképző élesztőtörzsek esetében a rögzülés mechanizmusa feltételezhetően ugyanaz, mint a polisztirolhoz való adhézió esetében, azaz a ferdén elhelyezett fedőlemez felszínére leülepedő sejtek

hozzátapadtak az üveghez, ami a polisztirolhoz való adhéziohoz hasonlóan hidrofób kölcsönhatás jelenlétére utal. A tenyésztés során a kémcső falán megjelenő vékony élesztősejt réteg pedig csak a kémcső helyzetének a függőlegetől kismértékben való eltérésére vezethető vissza.

A hártaképző élesztőgombák táptalajhoz való adhéziojának illetve invazív növekedésének vizsgálatához, a törzseket a táptalajra való felvitel után 3 napig tenyésztettem, majd az agar felszínét gyenge sugarú csapvízzel mostam. A hártaképző borélesztők a 02/62.1 és a 02/62.2 törzsek kivételével nem voltak eltávolíthatóak a táptalaj felszínéről (**28. ábra**). A vizsgálat során nem lehetett az élesztősejteknek a táptalajba való penetrációját vagy álhifás növekedést megfigyelni, a sejtek adhézioja elégnak bizonyult a táptalajhoz való rögzüléshez. A negatív kontrollként alkalmazott élesztők (PM 322 és Badacsony1 jelzésű borélesztők, CBS 1171 *S. cerevisiae* típustörzs, S288c labortörzs) telepei kivétel nélkül lemosódtak, míg a pozitív kontrollként alkalmazott YHUM 272-es invazív törzs (van Dyk et al., 2003) a hártaképzőkhöz hasonlóan a táptalajhoz rögzült. A TD04-es törzs haploid szegregánsait vizsgálva nem tapasztaltam eltérést a diploid szülő és haploid utódok adhézioja között.



28. ábra: Példa élesztőgombák táptalajhoz való adhéziojának vizsgálatára.

A/ telepek morfológiája agarlemezen B/ telepek eltávolíthatósága vízszaggárral való mosással

1. B1*, 2. B3*, 3. TD01.2*, 4. TD04*, 5. M4.1*, 6. 02/62.1*, 7. CBS 1171, 8. CBS 380, 9. S288c, 10. PM 322, 11. Badacsony1, 12. YHUM 272

*: hártaképző borélesztők

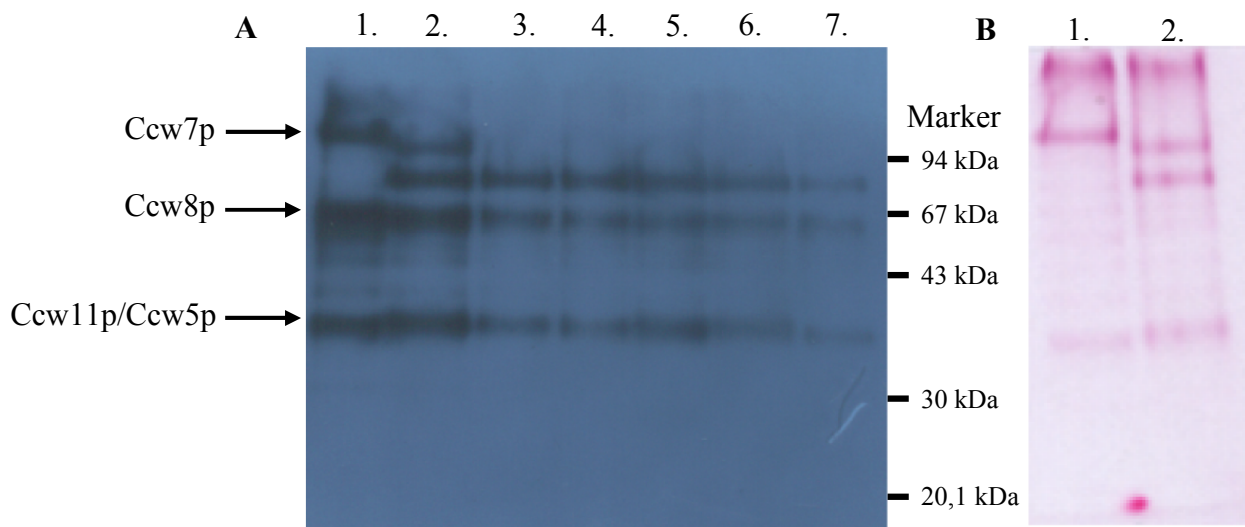
5.10. A hidrofóbicitás és a hártaképzés alakulása aszpirin jelenlétében

Az aszpirin kis koncentrációban bizonyítottan gátolja mind a patogén élesztőgombák biofilm képzését (Alem és Douglas, 2004), mind pedig a flokkulens sejtek aggregálódását (Strauss et al., 2005). A szilárd felszínen történő biofilm képzés, a flokkuláció, valamint a folyadék felszíni hártaképzés eltérő mechanizmusokkal történik, de mindegyik folyamatban sejt felszíni molekulák játszanak szerepet. Kock és mtsi. (2000) kapcsolatot mutatottak ki a flokkuláció és a sejt felszíni oxilipinek jelenléte, valamint a sejtek hidrofóbicitása között. Ennek tükrében érdemesnek láttam az aszpirin hártaképző sejtek hidrofóbicitására és hártaképzésére gyakorolt hatásának tanulmányozását. Az aszpirin hatásának vizsgálatához a hártaképző sejteket 0; 0,1; 0,25; 0,5 illetve 1 mM aszpirt tartalmazó YEPD táplevesben előtenyésztettem. A tenyésztést követően a sejtek hidrofóbicitását meghatározva nem találtam különbséget az eltérő feltételek mellett szaporított sejtek esetében. Az előtenyésztést követően a sejteket 0; 0,1; 0,25; 0,5 illetve 1 mM aszpirt és 6 % etanolt tartalmazó YEP(D) táptalajba átolítottam és a hártaképzést 1 héten keresztül nyomon követtem. Az aszpirin nem gátolta a hártaképzést az alkalmazott koncentrációkban, sőt a 0,1 mM illetve a 0,25 mM aszpirin jelenléte az előtenyésztés során fokozta a hártaképzés gyorsaságát. Ezen eredményekből arra lehet következtetni, hogy az oxilipineknek nem játszanak szerepet a *Saccharomyces cerevisiae* által képzett hártaképzés kialakításában.

5.11. Hártaképző élesztőgombák sejtalfehérjéinek analízise

Mivel a hártaképzésben kulcsszerepe van a sejtalfehérjéknek, ezért célul tűztam ki a hártaképző és a nem hártaképző *S. cerevisiae* törzsek sejtalfehérjéi közötti eltérések vizsgálatát. A sejtalfehérjék vizsgálatához kivontam mind a kovalensen, mind a nem-kovalensen kötődő fehérjéket. A hártaképző élesztők poliakrilamid gélen elválasztott fehérjemintázatát a SEY6210 labortörzs mintázatához hasonlítottam. Az SDS-sel kivonható nem-kovalensen kötődő és a glükánázzal kivonható kovalensen kötődő (GPI-kötődésű) fehérjék mintázata között nem találtam különbséget. A NaOH-dal kivonható kovalensen kötődő (PIR fehérjék) fehérjék közül a Ccw8p és a Ccw11p mérete a labortörzs és a hártaképzők esetében megegyezett, azonban a hártaképző törzsekben a kb. 117 kDa nagyságú Ccw7p/Pir2p/Hsp150p nem volt kimutatható (**29. (A) ábra**). Egyedül a TD04 törzs esetében lehetett egy a Ccw7p méretével nagyjából megegyező méretű (kb. 115 kDa) fehérjét kimutatni. Megjelent viszont az összes hártaképző élesztő esetében egy kb. 87 kDa nagyságú többlet fehérjesáv. Annak ellenőrzésére, hogy ez az újonnan megjelent 87 kDa nagyságú fehérje egy eddig ismeretlen fehérje-e, vagy csak a Ccw7p egy módosulata, az

izolált fehérje N-terminális részét megszekvenáltattam. Az eredményként kapott aminosav szekvenciát (AAXQIGDXEVQA) összehasonlítottam a *Saccharomyces cerevisiae* S288c törzs SGD adatbankban található aminosav szekvenciájával (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/seqTools>) Ez alapján a kapott szekvencia a Ccw7p N-terminális szekvenciájának felelt meg. A fehérje kisebb molekulaméretének egyik oka az kisebb glikozilációs szint lehet, ezért az elektroforézissel elválasztott fehérjék szénhidrát oldalláncait megfestettem (Zacharius et al., 1969) (**29. (B) ábra**). A fehérje sávok azonos intenzitással festődtek, tehát a méretkülönbség nem a fehérje eltérő glikoziláltságára volt visszavezethető.



29. ábra: Hártaképző élesztőgombák NaOH-dal kivonható sejtfalfehérjéi

1. SEY6210, 2. TD04*, 3. B1*, 4. B4*, 5. TD01.2*, 6. M4.1*, 7. 02/62.1*

*: hártaképző borélesztők

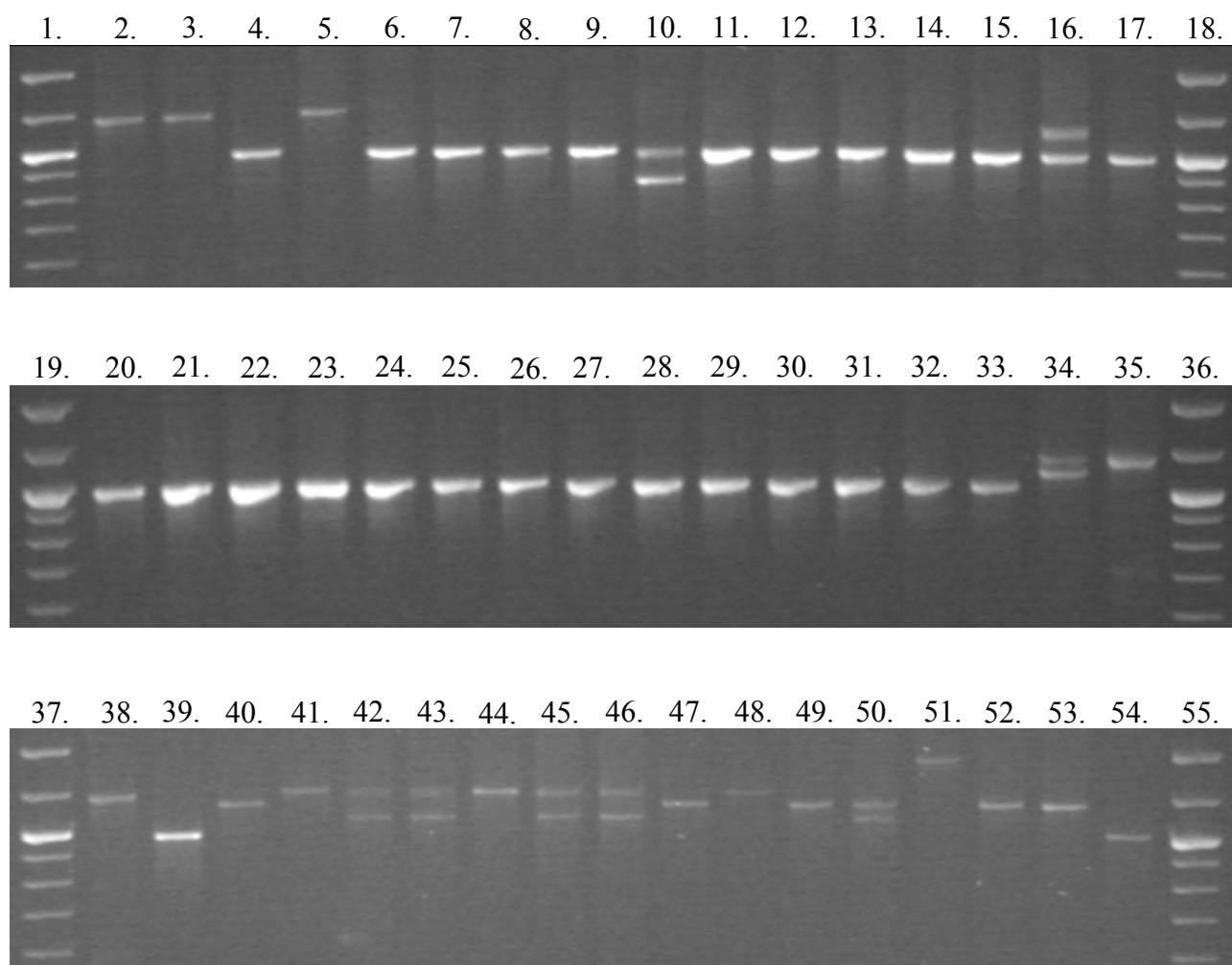
5.12. A *CCW7/HSP150* gén vizsgálata

Annak ellenőrzésére, hogy a hártaképzők esetében tapasztalt kisebb Ccw7p/Hsp150p méret a *CCW7/HSP150* gén kisebb méretére vezethető-e vissza, a *HSP150* génre egy specifikus primer-párt terveztem (SGD adatbank Web Primer programja). A tervezett primer-pár:

forward primer [C7-f]: CTACTACATTGGCCGCCTATGCTC és

reverse primer [C7-r]: CGATAGCTTCCAAGTGGACTGGAG) segítségével a 1242 bp nagyságú *HSP150* génből elvileg egy 1185 bp nagyságú rész szaporítható fel PCR segítségével. A SEY6210 és az S288c labortörzsek, valamint a borélesztők PCR termékeinek méretét összehasonlítva (**30. ábra**), csak a SEY6210 és a Badacsony1 jelű törzs esetében kaptam az S288c törzsszel megegyező méretű terméket. Az összes hártaképző élesztőgomba egy rövidebb, 1015 bp-os PCR terméket eredményezett. Két törzs esetében azonban egy további termék jelent meg a PCR

reakció során. Az egyik törzs a TD04, amelynél egy nagyobb (1140 bp) termék keletkezett, már a sejtfalfehérjék vizsgálatakor is két fehérje sávot mutatott (**29. ábra**). A másik törzs a B8 jelű hártaképző volt, amely esetében a hártaképzőkre jellemző PCR termék mellett egy kisebb, 890 bp-os termék is megjelent. A vizsgálat során a nem-hártaképző borélesztők *HSP150* génjének felszaporításával kapott amplikonok nagymértékű hossz polimorfizmust mutattak az 1015 bp és 1500 bp méret közötti intervallumban. A 17 nem hártaképző borélesztő közül öt törzs (I/11/A, II/0/7, I/4/12, I/5/A, II/5/1) szintén heterozigóta volt a *CCW7* génre nézve, míg két törzs (a PM 322, illetve a 34/1.03) a hártaképző törzsekre jellemző 1015 bp-os PCR terméket eredményezett.



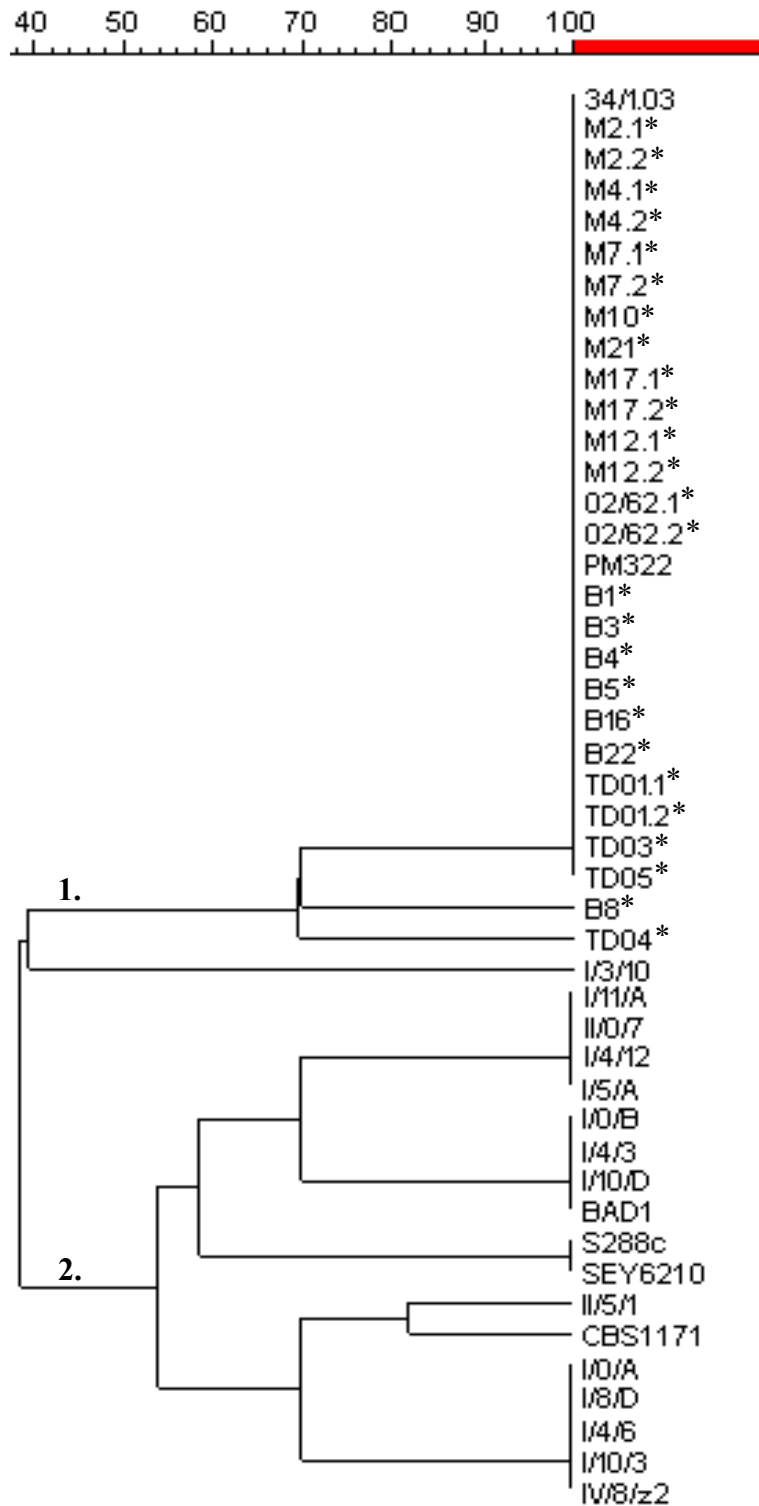
30. ábra: Borélesztők *HSP150* szekvenciájának polimorfizmusa

1. Marker, 2. S288c, 3. SEY6210, 4. PM 322, 5. Badacsony1 6. B1*, 7. B3*, 8. B4*, 9. B5*, 10. B8*, 11. B16*, 12. B22*, 13. TD01.1*, 14. TD01.2*, 15. TD03*, 16. TD04*, 17. TD05*, 18-19. Marker, 20. M2.1*, 21. M2.2*, 22. M4.1*, 23. M4.2*, 24. M7.1*, 25. M7.2*, 26. M10*, 27. M21*, 28. M17.1*, 29. M17.2*, 30. M12.1*, 31. M12.2*, 32. 02/62.1*, 33. 02/62.2*, 34. CBS 1170, 35. CBS 380, 36-37. Marker, 38. S288c, 39. M2.1*, 40. I/0/A, 41. I/0/B, 42. I/11/A, 43. II/0/7, 44. I/4/3, 45. I/4/12, 46. I/5/A, 47. I/8/D, 48. I/10/D, 49. II/4/6, 50. II/5/1, 51. I/3/10, 52. I/10/3, 53. IV/8/z2, 54. 34/1.03, 55. Marker

*: hártaképző borélesztők

5.12.1. A *HSP150* gén RFLP analízise

A *HSP150* szekvencia polimorfizmusának megállapítása érdekében elvégeztem a felszaporított termékek RFLP analízisét az *Rsa*I, a *Hae*III és a *Kpn*I restriktációs endonukleázokkal. A gélképek alapján készített kombinált dendogramot a **31. ábra** mutatja.



31. ábra: Borélesztők *HSP150* génjének RFLP dendogramja. A hártaképző törzseket * jelöli.

A dendrogram alapján a törzsek két fő csoportot alkotnak (1. és 2.), amelyek 40 % hasonlósági szintnél válnak el. A hártýaképző élesztőgombák az 1. csoportba tartoznak, egymással 100 % hasonlóságot mutatva. Ez alól csak a TD04 és a B8 törzsek képeznek kivételt, amelyek kettős PCR terméket eredményeztek, ezáltal bár az 1. csoportba tartoznak, de a többi hártýaképzőtől 70 % hasonlósági szintnél elválnak. Három nem-hártýaképző élesztőgomba kivételével a nem-hártýaképzők a 2. csoportba tartoznak. A három kivétel közül kettő törzs (PM 322 és 34/1.03) a *HSP150* gén RFLP analízise szerint teljesen megegyezik a hártýaképzőkkel. A harmadik törzs (I/3/10) mind a két csoporttól egyértelműen elkülönül, ezen törzs már a gélelektroforézis során is kiugró méretű PCR terméket mutatott (1500bp).

5.12.2. A *HSP150* gén polimorfizmusának meghatározása szekvenálással

A *HSP150* allélok nukleotid és aminosav szekvencia polimorfizmusának vizsgálatához megszekvenáltattam az S288c labortörzs, és az RFLP analízis alapján az 1. klaszterba tartozó B1, TD01.2 és M4.1 hártýaképzők, valamint a velük hasonlóságot mutató PM 322 és 34/1.03 borélesztő törzsek *HSP150* génjének amplikonjait. A **32. ábrán** látható a szekvencia alapján lefordított aminosav sorrend.

Az összes vizsgált törzs a Pir génekre jellemző tulajdonságot mutatta, mivel számos tandem ismétlődést tartalmaztak, amelyek egy hosszú, ismétlődő szekvenciákat tartalmazó régiót eredményeztek a *HSP150* génen belül. Az ismétlődő szekvenciák eltéréseket mutattak a vizsgált törzsek között. Az S288c labortörzs szekvenciája megegyezett a *S. cerevisiae* adatbankban (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/seqTools>) található szekvenciával. A hártýaképző és nem-hártýaképző borélesztők esetében egyaránt az ismétlődő régió belül két szegmens hiányzott, a közelebbi egy 144 bp-os a távolabbi egy 57 bp-os deléciónak felelt meg. Az összes vizsgált fehérje tartalmazta a Kex2 proteáz hasítási helyet. A borélesztők Hsp150p aminosav szekvenciája a delációkon kívül a következő helyeken mutatott még eltérést az S288c törzs szekvenciájához képest: az első és a tizenegyedik ismétlődő szekvenciában szerin (S) található a treonin (T) helyett, illetve a hatodik ismétlődő szekvenciában izoleucin (I) található a valin (V) helyett. Ezen felül az ötödik ismétlődő szekvenciában egy izoleucin (I) és valin (V) váltakozást lehet megfigyelni. A vizsgált 5 borélesztő a szekvencia alapján két csoportba tartozik: (i): B1, PM 322, TD01.2 és (ii) 34/1.03, M4.1.

Az RFLP analízis alapján a 2. klaszterba tartozó nem-hártýaképző borélesztők közül az I/0/A és az I/0/B törzsek lettek kiválasztva szekvenálásra, ugyanis annak ellenére, hogy azonos RAPD

csoportba tartoznak, eltérő *HSP150* allélt hordoznak. Az I/0/A törzs által hordozott allél másik négy (I/8/D, I/4/6, I/10/3 és IV/8/z2), míg az I/0/B által hordozott allél másik három borélesztőben (I/4/3, I/10/D és Badacsony1) is jelen van. Az I/0/B által hordozott allél ezen felül még 4 borélesztőben is kimutatható egy kisebb alléllal való kombinációban (I/11/A, II/0/7, I/4/12 és I/5/A). A két törzs Hsp150p aminosav szekvenciája a **33. ábrán** látható az S288c és az egyik hártaképző szekvenciájához hasonlítva. Mindkét megszekvenált borélesztő a hártaképzőkre jellemző változásokat mutatja. Az egyetlen különbség, hogy a hártaképzőknél hiányzó 3. ismétlődő szekvenciát tartalmazzák, még hozzá különböző kópiaszámban, amelynek következtében kialakul a *HSP150* gén hossz-polimorfizmusa.

S288c	MQYKKTLVAS	ALAATTLAAY	APSEPWSTLT	PTATYSGGVT	DYASTFGIAV	QPISTTSSAS	SAATTA	SSKA
PM322					GVT DYASTFGIAV	QPISTTSSAS	SAATTA	SSKA
34/1.03					GVT DYASTFGIAV	QPISTTSSAS	SAATTA	SSKA
B1*					GVT DYASTFGIAV	QPISTTSSAS	SAATTA	SSKA
M4.1*					GVT DYASTFGIAV	QPISTTSSAS	SAATTA	SSKA
TD01.2*					GVT DYASTFGIAV	QPISTTSSAS	SAATTA	SSKA

	1.	2.	3.	4.
S288c	KRAASQIGDG	QVQAATTTAS	VSTKSTAAAV	SQIGDGQIQ
PM322	KRAASQIGDG	QVQAATTTAS	VSTKSSAAAV	SQIGDGQIQ
34/1.03	KRAASQIGDG	QVQAATTTAS	VSTKSSAAAV	SQIGDGQIQ
B1*	KRAASQIGDG	QVQAATTTAS	VSTKSSAAAV	SQIGDGQIQ
M4.1*	KRAASQIGDG	QVQAATTTAS	VSTKSSAAAV	SQIGDGQIQ
TD01.2*	KRAASQIGDG	QVQAATTTAS	VSTKSSAAAV	SQIGDGQIQ

	5.	6.	7.
S288c	AAVSQIGDGQ	IQATTTTLAP	KSTAAVSQI
PM322	AAVSQI	GDGQVQATT	TLAPKSTAAA
34/1.03	AAVSQI	GDGQVQATT	TLAPKSTAAA
B1*	AAVSQI	GDGQVQATT	TLAPKSTAAA
M4.1*	AAVSQI	GDGQVQATT	TLAPKSTAAA
TD01.2*	AAVSQI	GDGQVQATT	TLAPKSTAAA

	8.	9.	10.
S288c	SQIGDGQVQA	TTKTTAAAVS	QIGDGQVQAT
PM322	SQIGDGQVQA	TTKTT	AAVSQ
34/1.03	SQIGDGQVQA	TTKTT	AAVSQ
B1*	SQIGDGQVQA	TTKTT	AAVSQ
M4.1*	SQIGDGQVQA	TTKTT	AAVSQ
TD01.2*	SQIGDGQVQA	TTKTT	AAVSQ

	11.
S288c	TTQAASQVSD
PM322	TTQAASQVSD
34/1.03	TTQAASQVSD
B1*	TTQAASQVSD
M4.1*	TTQAASQVSD
TD01.2*	TTQAASQVSD

S288C	GPPPQAGAIY	AAGWSITPDG	NLAIGDNDVF	YQCLSGTFYN	LYDEHIGSQC	TPVHLEAIDL	IDC
PM322	GPPPQAGAIY	AAGWSITPDG	NLAIGDND				
34/1.03	GPPPQAGAIY	AAGWSITPDG	NLAIGDNDVF	YQCLSGTFYN	LYD		
B1*	GPPPQAGAIY	AAGWSITPDG	NLAIGDNDVF	YQCLSGTFYN	LYD		
M4.1*	GPPPQAGAIY	AAGWSITPDG	NLAIGDNDVF	YQCLSGTFYN	LYD		
TD01.2*	GPPPQAGAIY	AAGWSITPDG	NLAIGDNDVF	YQCLSGTFYN	LYD		

32. ábra: Borélesztők Hsp150p aminosav szekvenciája. Sárgával kiemelve a Kex2 proteáz hasítási hely látható. A hártaképző törzseket * jelöli.

S288c	MQYKKTLVAS ALAATTLAAY APSEPWSTLT PTATYSGGVT DYASTFGIAV QPISTTSSAS SAATTASSKA
M4.1*	GVT DYASTFGIAV QPISTTSSAS SAATTASSKA
I/O/A	GVT DYASTFGIAV QPISTTSSAS SAATTASSKA
I/O/B	GVT DYASTFGIAV QPISTTSSAS SAATTASSKA

	1. ←	2. →	3. →
S288c	KRAASQIGDG QVQAATTTAS VSTKSTAAAV SQIGDGQIQAT TTKTTAAAVS QIGDGQIQAT TKTTSAKTT.		
M4.1*	KRAASQIGDG QVQAATTTAS VSTKSSAAAV SQIGDGQIQAT TTKTT.....		
I/O/A	KRAASQIGDG QVQAATTTAS VSTKSSAAAV SQIGDGQIQAT TTKTTAAAVS QIGDGQIQAT TKTTSAKTTA		
I/O/B	KRAASQIGDG QVQAATTTAS VSTKSSAAAV SQIGDGQIQAT TTKTTAAAVS QIGDGQIQAT TKTTSAKTTA		

	4. ←
S288c	AAA VSQIGDGQIQ ATTTTLAPKS
M4.1*	
I/O/A	AAVSQIGDGQ IQATTKTTSA KTT.....
I/O/B	AAVSQIGDGQ IQATTKTTSA KTTAAAVSQI GDGQIQATTK TTSAKTT...

	5. ←	6. →	7. →	8. →
S288c	TAAAVSQIGD GQVQATTTTL APKSTAAAVS QIGDGQVQAT TKTAAAVSQ IGDGQVQATT KTTAAAVSQI			
M4.1*	.AAAVSQIGD GQIQATTTTL APKSTAAAVS QIGDGQIQAT TKTAAAVSQ IGDGQVQATT KTT.....			
I/O/A	.AAAVSQIGD GQIQATTTTL APKSTAAAVS QIGDGQIQAT TKTAAAVSQ IGDGQVQATT KTT.....			
I/O/B	.AAAVSQIGD GQIQATTTTL APKSTAAAVS QIGDGQIQAT TKTAAAVSQ IGDGQVQATT KTT.....			

	9. →	10. →	11. →
S288c	GDGQVQATTK TTAAAVSQIG DGQVQATTKT TAAAVSQITD GQVQATTKTT QAASQVSDGQ VQATTATSAS		
M4.1*	AAAVSQIG DGQVQATTKT TAAAVSQITD GQVQATTKTT QAASQVSDGQ VQATSATSAS		
I/O/A	AAAVSQIG DGQVQATTKT TAAAVSQITD GQVQATTKTT QAASQVSDGQ VQATSATSAS		
I/O/B	AAAVSQIG DGQVQATTKT TAAAVSQITD GQVQATTKTT QAASQVSDGQ VQATSATSAS		

S288c	AAATSTDPVD AVSCKTSGTL EMNLKGGILT DGKGRIGSIV ANRQFQFDGP PPQAGAIYAA GWSITPDGNL
M4.1*	AAATSTDP VDAVCKTSG TLEMNLKGGI LTDGKGRIGS IVANRQFQFDGP PPQAGAIYAA GWSITPDGNL
I/O/A	AAATSTDPVD AVSCKTSGTL EMNLKGGILT DGKGRIGSIV ANRQFQFDGP PPQAGAIYAA GWSITPDGNL
I/O/B	AAATSTDPVD AVSCKTSGTL EMNLKGGILT DGKGRIGSIV ANRQFQFDGP PPQAGAIYAA GWSITPDGNL

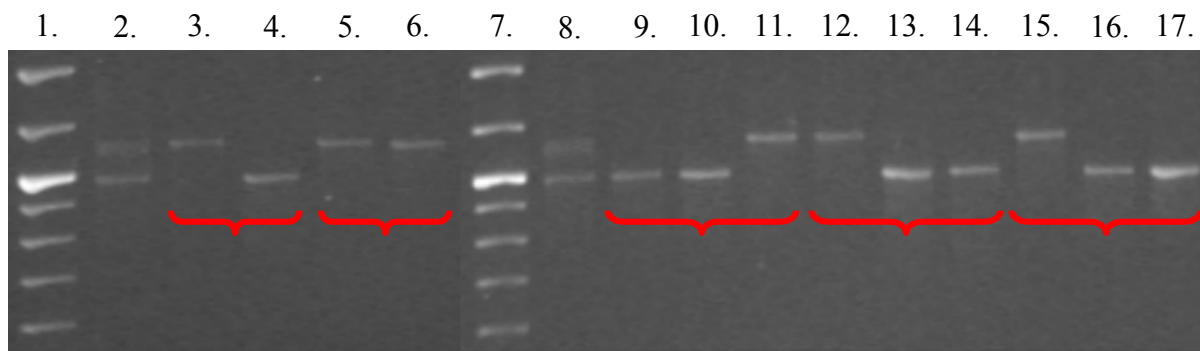
S288c	AIGDNDVFYQ CLSGTFYNLY DEHIGSQCTP VHLEAIDLID C
M4.1*	AIGDNDVFYQ CLSGTFYNLY D
I/O/A	AIGDNDVFYQ CLSGTFYNLY D
I/O/B	AIGDNDVFYQ CLSGTFYNLY D

33. ábra: Nem-hártyaképző borélesztők Hsp150p aminosav szekvenciája. Sárgával kiemelve a Kex2 proteáz hasítási hely látható. A hártyaképző törzset * jelöli.

5.12.3. A *HSP150* allélok szegregációja

Egyes borélesztők esetében a *HSP150* gén felszaporítása esetén kettős PCR termék keletkezett, amely eltérő méretű allélok jelenlétére utalt. Ilyen törzs a TD04 hártvaképző borélesztő is, amely törzsből meiotikus szegregánsokat izoláltam. A szegregánsok *HSP150* génjének C7-f és a C7-r primer-pár segítségével felszaporított PCR-termékeire látható példa a **34. ábrán**.

A diploid törzsben jelen lévő allélok a spórázás során szegregáltak, az utódok vagy csak a rövidebb (1015 bp), vagy csak a hosszabb (1140 bp) gént tartalmazták. A szegregálódó allélok és a spórák csökkent életképessége között nem találtam összefüggést, továbbá mindkét típusú szegregáns megtartotta hártvaképző képességét és hasonló sejtfal hidrofóbicitási értékkel rendelkezett.



34. ábra: A *HSP150* gén szegregációjának vizsgálata a hártvaképző TD04 törzs esetében (2, illetve 3 túlélő spóra aszkuszonként), az egy aszkuszból származó haploidokat piros kapcsos-zárójellel jelöltem

1. Marker (100bp-os létra), 2. TD04 diploid, 3. 1a, 4. 1b, 5. 2a, 6. 2b, 7. Marker (100 bp-os létra), 8. TD04 diploid, 9. 4a, 10. 4b, 11. 4c, 12. 5a, 13. 5b, 14. 5c, 15. 6a, 16. 6b, 17. 6c

Két eltérő allélt hordozó szegregáns (1a és 1b) *HSP150* génjének megszekvenálása, majd a kódolt aminosav sorrend alapján (**35. ábrán**) kiderült, hogy a kisebb méretű (1015bp) allélt hordozó 1b szegregáns 100 % hasonlóságot mutat a 34/1.03 és az M4.1 törzsek alkotta csoporttal. Az 1a szegregáns az 1b-hez képest egy 135 bp-os insercióval rendelkezik az 5. ismétlődő szakaszon belül. Az inserció (az ábrán aláhúzással jelölve) a gén 250-as és 385-ös nukleotidja közötti szekvenciával azonos, feltehetőleg az inserció ezen régió duplikációjával jött létre.

S288c	MQYKKTLVAS ALAATTLAAY APSEPWSTLT PTATYSGGVT DYASTFGIAV QPISTTSSAS SAATTASSKA
M4.1*	GVT DYASTFGIAV QPISTTSSAS SAATTASSKA
TD04/1b*	GVT DYASTFGIAV QPISTTSSAS SAATTASSKA
TD04/1a*	GVT DYASTFGIAV QPISTTSSAS SAATTASSKA

	1. 2. 3. 4.
S288c	KRAASQIGDG QVQAATTAS VSTKSTAAV SQIGDGQIQ TTKTTAAVS QIGDGQIQAT TKTTSAKTTA
M4.1*	KRAASQIGDG QVQAATTAS VSTKSSAAV SQIGDGQIQ TTKTT.....
TD04/1b*	KRAASQIGDG QVQAATTAS VSTKSSAAV SQIGDGQIQ TTKTT.....
TD04/1a*	KRAASQIGDG QVQAATTAS VSTKSSAAV SQIGDGQIQ TTKTT.....

	5.
S288c	AAVSQIGDGQ IQATTTTLAP KSTAAVSQI GDGQVO.....
M4.1*	 AAASQI GDGQIQ.....
TD04/1b*	 AAASQI GDGQIQ.....
TD04/1a*	 AAASQI GDGQIQ AATT TASVSTKSSA AAVSQIGDGQ IQATTKTTAA

	6. 7. 8.
S288c	ATTTTLAPK STAAVSQIG DGQIQATTKT TAAVSQIGD GQVQATTKTT AAASQIGDG
M4.1*	ATTTTLAPK STAAVSQIG DGQIQATTKT TAAVSQIGD GQVQATTKTT
TD04/1b*	ATTTTLAPK STAAVSQIG DGQIQATTKT TAAVSQIGD GQVQATTKTT
TD04/1a*	AVSQIGDGQI QATTTTLAPK STAAVSQIG DGQIQATTKT TAAVSQIGD GQVQATTKTT

	9. 10. 11.
S288c	QVQATTKTTA AAVSQIGDGQ VQATTKTTAA AVSQITDGQV QATTKTTQAA SQVSDGQVQA TTATSASAAA
M4.1*	A AAVSQIGDGQ VQATTKTTAA AVSQITDGQV QATTKTTQAA SQVSDGQVQA TSATSASAAA
TD04/1b*	A AAVSQIGDGQ VQATTKTTAA AVSQITDGQV QATTKTTQAA SQVSDGQVQA TSATSASAAA
TD04/1a*	A AAVSQIGDGQ VQATTKTTAA AVSQITDGQV QATTKTTQAA SQVSDGQVQA TSATSASAAA

S288c	TSTDPVDAVS CKTSGTLEMN LKGGILTDGK GRIGSIVANR QFQFDGPPPQ AGAIYAAGWS ITPDGNLAIG
M4.1*	TSTDPVDAVS CKTSGTLEMN LKGGILTDGK GRIGSIVANR QFQFDGPPPQ AGAIYAAGWS ITPDGNLAIG
TD04/1b*	TSTDPVDAVS CKTSGTLEMN LKGGILTDGK GRIGSIVANR QFQFDGPPPQ AGAIYAAGWS ITPDGNLAIG
TD04/1a*	TSTDPVDAVS CKTSGTLEMN LKGGILTDGK GRIGSIVANR QFQFDGPPPQ AGAIYAAGWS ITPDGNLAIG

S288C	DNDVFYQCLSGTFYNLYDEHIGSQCTPVHLEAIDLIDC
M4.1*	DNDVFYQCLSGTFYNLYD
TD04/1b*	DNDVFYQCLSGTFYNLYD
TD04/1a*	DNDVFYQCLSGTFYNLYD

35. ábra: A TD04 szegregánsok Hsp150p aminosav szekvenciája. Sárgával kiemelve a Kex2 proteáz hasítási hely látható. A hártyaképző törzseket * jelöli. Az aláhúzás az inserciót, míg a szaggatott vonallal a duplikációra kerülő régiót jelöli.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

6.1. A hártaképző élesztőgombák fiziológiai jellemzése

A hártaképzés, valamint a hártaképző élesztők anyagcseréje speciális körülmények között zajlik. Vizsgálataim szerint az élesztők teljes mértékben adaptálódtak a bor felszínén való szaporodáshoz. A sherry borok esetében a hártaképzés csak száraz borok felszínén következik be, míg a szamorodni boroknál egyes esetekben édes borok felszínén is meg lehetett figyelni összefüggő élesztőhártak kialakulását. A glükóz koncentráció szaporodásra gyakorolt hatása nem különbözött a száraz, illetve az édes szamorodniból származó izolátumok esetében, sőt a törzsek hozama az eltérő koncentrációk esetében a borok erjesztését végző borélesztők hozamával mutatott hasonlóságot, ami arra utal, hogy a magyar hártaképző borélesztők is képesek lehetnek a mustot borrá kierjeszteni, hasonlóan a spanyol Sherry borok készítésénél használt flor élesztőkhöz. Valószínű, hogy a must erjedésénél szuszpenzióban növe erjesztenek, majd az alkoholos fermentáció lezajlása után a felszínre felemelkedve és hártát kialakítva oxidatív metabolizmust folytatnak. A különböző glükóz koncentrációknak egyedül a hártaképzés idejére volt eltérő hatása, ugyanis az édes borból származó izolátum hártaképzése kis glükóz koncentrációk esetében (10-75 g/l) kitolódott. A borok 12 % körüli etanol koncentrációja a hártaképző élesztők szaporodását lassítja, de a gyors hártaképzést nem gátolja. A hártaképző törzsek kivétel nélkül képesek túlélni még a 18 %-os etanol koncentrációt is, igaz, ilyen nagy koncentrációnál a hártaképzés elmarad. Ebből a szempontból a szamorodni hártaképzők hasonlóak a sherry törzsekhez, például az oloroso borok alkoholtartalmát az oxidatív érlelés előtt 18 %-os értékre állítják be, hogy meggátolják a hártaképző élesztők aktivitását (Botella et al., 1990). A szaporodás és a hártaképzés pH optimuma a legtöbb *Saccharomyces* számára optimálisnak tartott 5-ös értéknél kisebb és megfelel a borok pH értékének.

A savas pH értékek kedvező hatással vannak a hártaképzők sejtfelszínének hidrofób jellegére, amely szerepet játszhat a sejtek hártává való összeállásában (Alexandre et al., 1998). A nem-hártaképző élesztők felszíne minden pH érték esetében hidrofilnek bizonyult. A sejtek hidrofóbicitását sejtfelszíni zsírsavak is okozhatják, ugyanis Iimura és mtsi. (1980b) kimutatták, hogy lúggal való kezelés, amely a sejtfelszínen lévő zsírsavakat távolítja el, a hidrofóbicitást erősen csökkenti. Vizsgálataim szerint a hártaképző élesztők sejtfelszíne lúgos pH érték esetén szintén hidrofil. Az aszpirin – amely gátolja a hidroxilipinek képződését (Alem és Douglas, 2004) – nem okozott változást a sejtek hidrofóbicitásában és a hártaképzésre sincs negatív hatással, tehát

kizárható az oxidált zsírsavak szerepe a hártaképzők sejt felszínének hidrofóbicitásában. Kimutatták, hogy a nagy hidrofób értékeket leggyakrabban a sejt falhoz kapcsolódó fehérjék okozzák (Kang és Choi, 2005), ezt alátámasztja, hogy fehérjebontó enzimek hatására a sejt felszín hidrofóbicitása erősen csökken, egyes esetekben hidrofíllé is válik. A hártaképzésben és a hidrofóbicitás kialakításában feltételezhetően más fehérjék vesznek részt, ugyanis a hártaképzés előtt nem lehet megfigyelni a hidrofóbicitás emelkedését, mint pl. a flokkulációnál.

A hártaképző élesztők erős adhezív tulajdonsággal rendelkeznek, képesek mind a táptalaj, mind a polisztirol anyagokhoz, valamint az üveghez hozzátapadni, ezen adhéziós képesség hidrofób kölcsönhatások jelenlétére utal a sejt és a környezete között. Továbbá a *FLO11* gén túl-expresszálságára lehet következtetni, ugyanis az adhezív tulajdonság elsősorban haploid sejteknél figyelhető meg. A diploid sejtek adhéziója kisebb mértékű (Reynolds és Fink, 2001), azonban ez a képesség a *FLO11* túl-expresszáltatásával javítható (Lo és Dranginis, 1998).

Az általam vizsgált hártaképző élesztőgombák mindegyike képes volt spórázásra. Ez megegyezik Magyar (1984), valamint Guijo és mtsi. (1997) megfigyeléseivel, viszont eltér a Martinez és mtsi. (1995) által vizsgált hártaképző élesztőktől, amelyek egyáltalán nem spóráztak. A tokaji hártaképző törzsek spórázó képessége jelentősen eltért, sok volt az aberráns tetrad, azaz a létrejött aszkuszkban eltérő számú (1, 2, 3 és 4 db) haploid spóra keletkezett. A spórák életképessége nagyon kicsi, a spórák 27 % volt csak képes telepet képezni, ennek ellenére sikerült aszkuszonként nemcsak egy, hanem két vagy három életképes spórát is izolálnom. Az izolált haploidok esetében a hártaképzés képessége nem szegregálódott, mint a Santa Maria és Vidal (1973) által vizsgált törzs esetében. Emellett a haploidok sejt felszíne megőrizte a diploid szülőre jellemző, magas hidrofób értéket és az adhezív tulajdonságot.

A sherry borok populáció dinamikájával foglalkozó tanulmányok megtartják a *Saccharomyces cerevisiae* flor élesztők fiziológiai tulajdonságokon alapuló négy változatba való elkülönítését. Az általam vizsgálat tokaji szamorodni felületéről származó hártaképző élesztők jelentős része (83 %) a cukorerjesztési spektrum alapján a *S. cerevisiae* var. *beticus* változatához tartozik. Ez megegyezik Sancho és mtsi. (1986), valamint Martinez és mtsi. (1997a) vizsgálatainak eredményeivel, amelyek alapján a sherry érlelése folyamán a hártából izolált élesztőgombák között a *S. cerevisiae* var. *beticus* dominált.

Martinez és mtsi. (1995) összefüggést találtak a flor *S. cerevisiae* különböző fiziológiai változata és killer toxin érzékenysége között. A tokaji borvidékről származó hártaképző élesztőgombák ezt a különbséget nem mutatták, egy törzs kivételével (TD01.1) nem voltak érzékenyek a *S. cerevisiae*

K1, K2, KTA és K28 killer toxinokra. A vizsgált flor élesztők szintén rezisztensek voltak a killer-toxinra. Míg a szamorodniról származó hártvaképzők között nem találtam toxin-termelő törzset, a külföldi flor élesztők közül a moldáviai (B3) flor élesztő toxintermelő törzsnek bizonyult.

6.2. A hártvaképző élesztőgombák taxonómiai helyzete és molekuláris jellemzése

A tokaji szamorodni területén lévő hártvakából izolált hártvaképző élesztők valamennyien a *S. cerevisiae* fajhoz tartoztak, mint azt az rDNS RFLP és RAPD analízis bizonyította. Ez megegyezik Martinez és mtsi. (1997a) vizsgálati eredményeivel, akik a sherry hártvakából 95 %-ban a *S. cerevisiae* fajhoz tartozó törzseket izoláltak. A RAPD-PCR analízis során valamennyi hártvaképző törzs nagyfokú (86 %-os) hasonlóságot mutatott a *S. cerevisiae* típustörzsszel, egymással pedig 100 %-ban megegyező mintázatot adtak, valamennyi RAPD primer esetében. Utóbbi eredmény a hártvaképző törzsek izogénikus voltára utal.

Fernandez-Espinar és mtsi. (2000) sherry flor élesztőket tanulmányozva kimutattak az rDNS ITS1 régiójában egy 24 bázispáros deléciót. Vizsgálataik alapján ajánlották, hogy csak az általuk leírt „flor mintázatot” mutató élesztőket lehessen hártvaképző élesztőknek tekinteni. A tokaji szamorodniból izolált hártvaképző élesztők rDNS-ét RFLP és heteroduplex analízissel vizsgálva megállapítottam, hogy a Tokaj régióból származó izolátumok jelentős része polimorf ITS1 régióval rendelkezik. Ezen törzsek genomja két eltérő típusú rDNS-t hordoz: 24 bp-os deléciót tartalmazó, valamint a deléciót nem tartalmazó ITS1 régiót. A három vizsgált külföldi flor élesztő (B1, B3 és B8) is tartalmazza a deléciót. A B1 spanyol sherry törzs polimorf rDNS-sel rendelkezik, a B8-as kaliforniai törzs szintén, azonban ebben az esetben a különböző típusú rDNS-ek eltérő arányban fordulnak elő. Egyedül a B3 moldáviai hártvaképző törzs mutatta a Fernandez-Espinar és mtsi. (2000) által leírt flor mintázatot. Három szamorodni hártvaképző törzs (B4, B5 és a B22) azonban nem tartalmazza a 24 bp-os deléciót, ami arra utal, hogy a hártvaképzők fejlődése több vonalon történt, ezért régióként eltérhet a genomjuk.

A TD04 diploid törzs meiotikus szegregánsainak rDNS régióját vizsgálva a két különböző típusú rDNS nem szegregálódott, tehát az eltérő rDNS szekvenciák minden XII-es kromoszómán kombinációban fordulnak elő. A polimorf ITS1 régió megjelenése, valamint a deléció „hiánya” egyes törzsekben a genom újrendeződésére vagy különböző törzsek hibridizációjára utal, amelynek során azonban a hártvaképződéshez szükséges gének/allélok megmaradtak.

6.3. Hártyaképző élesztőgombák sejtfalszerkezetének jellemzése

A hártyaképző törzsek sejtfalfehérjéinek mintázatát a jól jellemzett SEY6210 labortörzs fehérjemintázatával összehasonlítva egyedül a Ccw7p/Pir2p/Hsp150p méretében találtam különbséget, amely fehérje a Pir-fehérjék családjához tartozik, és a sejtfal lúgos kezelésével vonható ki. Molekuláris analízissel kimutattam, hogy a méretbeli különbség a *HSP150* gén repetitív régiójában bekövetkező deléciónak következménye, amely a *S. cerevisiae* S288c törzsnél 11 ismétlődő szekvencia egységet tartalmaz. Habár még nincs tisztázva, hogy van-e kapcsolat ezen Pir-fehérje deléciója és a sejtfelszíni tulajdonságok, valamint a hártyaképzés között, mindenesetre figyelemre méltó, hogy a hártyaképzők *HSP150* génje ugyanazt a szekvencia módosulást hordozza. Ez a megfigyelés főleg annak tekintetében meglepő, hogy a hártyaképző izolátumok különböző országokból származnak (Magyarország, Spanyolország, Moldávia, USA). Ráadásul a hártyaképző borélesztőkkel ellentétben a nem hártyaképző borélesztők *HSP150* génje nagyfokú méret polimorfizmust mutat. Számos borélesztő heterozigóta a *HSP150* génre, feltehetőleg az egyes kromoszómák különböző hosszúságú allélokat hordoznak, amely allélok minden esetben hosszabbak a hártyaképző élesztőgombákban található *HSP150* allélnál. Ezen eredmények alátámasztják a *HSP150* gén alkalmazhatóságát borélesztő törzsek tipizálására (Marinangeli et al., 2004b).

A TD04 diploid heterozigóta hártyaképző törzs analízise kimutatta, hogy a hosszabbik *HSP150* allél két extra ismétlődő szakaszt tartalmaz, amely a gén egy 135 bp-os régiójának intragénikus duplikációval jött létre, feltehetőleg a replikáció során fellépő szálcsúszás során. Számos sejtfelszíni fehérje tartalmaz ismétlődő szakaszokat (Verstrepen et al., 2005), amelyek száma törzsenként eltérhet az ismétlődő szakaszok gyakori rekombinációjának köszönhetően. Ez a variabilitás szerepet játszhat egyes sejtfelszíni tulajdonságok, mint pl. a hidrofóbicitás, flokkuláció vagy patogenitás megváltozásában (Klis et al., 2006). Ennek ellenére a Pir2p feltételezhetően nem járul hozzá közvetlenül a sejtfelszín hidrofób jellegének kialakításához, ugyanis a nem hártyaképző PM 322 és a 34/1.03 törzs felszíne hidrofíli tulajdonságú annak ellenére, hogy a hártyaképző borélesztőkkel megegyező szekvencia módosulást tartalmazza.

Alexandre és mtsi. (2000) a francia hártyaképző élesztők esetében egy 49 kDa nagyságú GPI-kötődésű hidrofób fehérjéről tudósítottak, amely egy másik Pir-fehérje, a Ccw5p/Pir4p méretére hasonlított. Annak ellenére azonban, hogy munkám során én is az ő általuk használt módszerrel dolgoztam, nem tudtam kimutatni a hártyaképzők glükánáz extraktumában ezt a fehérjét. A magyarázat lehet egyrészt az, hogy az általam vizsgált törzseknél a megfelelő fehérje molekula

tömege eltért, esetleg kisebb mennyiségben termelődött vagy pedig a fehérje nagyrésze kiválasztódott a tápközegbe.

6.4. Az elért kutatási eredmények gyakorlati vonatkozásai

Korábbi kutatási eredmények bizonyították, hogy a hártyaképző élesztőgombák fontos szerepet játszanak a Tokaji Szamorodni biológiai érlelésében, mivel anyagcseréjükkel hozzájárulnak ezen borok elvárt érzékszervi tulajdonságainak kialakulásához. Eredményeim szerint a Tokaji Borvidéken honos hártyaképző *S. cerevisiae* élesztőgombák azonosságuk mellett jelentős különbséget is mutatnak a Sherry illetve Sherry-típusú borok érlelésében részt vevő 'flor' élesztőktől. Ezek közül kiemelendő, hogy míg a Sherry és Sherry-típusú borok esetében hártyaképző törzseket kizárólag száraz borokból izoláltak, addig a Tokaji Szamorodni készítésekor hártyaképzés édes borok felszínén is megfigyelhető. Ez a jelenség ellentmond annak az élettani szabálynak, hogy az erjeszthető cukrok represszálják a nem erjeszthető szénforrásokat (pl. glicerin és etanol), ezért az édes borból származó izolátumok tudományos szempontból is újak számítanak. Gyakorlati alkalmazásuk révén (pl. starter tenyészetként) lehetőség nyílna az édes szamorodni hártya alatti érlelésének irányítására. A hártyaképző és nem-hártyaképző borélesztők azonos sejttozama arra enged következtetni, hogy a Tokaji Borászatokban kisselektált hártyaképző élesztőgombák starterkultúráként alkalmazhatók lehetnének a Tokaji Szamorodni irányított erjesztésében is. Fontos kérdésként merül fel, hogy a Tokaji Szamorodni spontán erjedése során jelen vannak-e hártyaképző borélesztők, és képesek-e az erjedés során dominánsá válni, vagy csak az erjedés végén, az alkoholtartalom emelkedésével kerülnek előtérbe. Ezért érdemesnek tartanám a szamorodni must főerjedésében részt vevő élesztők populáció dinamikájának részletes tanulmányozását. További kutatási feladat lehet annak vizsgálata, hogy a különböző pincészetekből származó hártyaképző törzsek kompetícióba lépnek-e eltérő paraméterekkel rendelkező szamorodni borokba beoltva és milyen mértékű szelekció játszódik le közöttük, képes-e egy törzs dominánssá válni. Ezen eredmények alapján lehetőség lenne eltérő technológiai tulajdonságokkal bíró starter hártyaképző törzsek kiválasztása és célzott alkalmazása.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- (1) A tokaji szamorodni felületén kifejlődött élesztőhártyából izoláltam a biológiai érlelésben résztvevő hártaképző élesztőket, amelyek vizsgálataim szerint a *Saccharomyces cerevisiae* faj flor változatához tartoznak. Kimutattam, hogy az izolált hártaképző *S. cerevisiae* borélesztő törzsek nagyfokú genom szerkezeti hasonlóságot mutatnak.
- (2) Megvizsgáltam, hogy a Fernandez-Espinar és mtsi. (2000) által leírt, a sherry flor élesztők rDNS ITS1 régiójában lévő 24 bp-os deléció, mint marker jellemző-e a tokaji borvidékről származó hártaképző élesztőknél is. Kimutattam, hogy a tokaji borvidékről származó hártaképző élesztők többsége dimorf rDNS-sel rendelkezik ebből a szempontból, azaz tartalmazzák mind a deléciós, mind pedig a deléció nélküli rDNS-t. Haploid meiotikus szegregánsok segítségével megállapítottam, hogy a dimorfizmus mindkét homológ kromoszómára jellemző.
- (3) Meghatároztam a hártaképzés szempontjából optimális glükóz és etanol koncentrációkat, valamint pH értéket. Kimutattam, hogy a tokaji hártaképző borélesztők sejt felszíne erősen hidrofób, míg a nem hártaképzők sejt felszíne hidrofíl. A hártaképző sejtek felszínének hidrofóbicitására a szaporodási fázis valamennyi szakaszában közel azonos volt. A hidrofóbicitásra egyedül a pH volt jelentős hatással, a hidrofóbicitás a pH emelésével (pH5-ről pH7-re) jelentősen csökkent. A hidrofób karakter mellett a hártaképzők sejt felszíne erős elektron donor tulajdonsággal rendelkezett. Megvizsgálva a hártaképző élesztők invazív növekedését, illetve adhézis képességét megállapítottam, hogy képesek a táptalaj, a műanyag és az üveg felületéhez rögzülni, ami hidrofób kölcsönhatások jelenlétének, valamint a *FLO11* gén túl-expressziójának tulajdonítható.
- (4) Összehasonlítottam a laboratóriumi és a hártaképző *S. cerevisiae* törzsek sejt fal fehérjéit. Megállapítottam, hogy a hártaképző élesztőgombák egyedül a Pir2 fehérje méretében különböznek a laboratóriumi *S. cerevisiae* törzstől, amely méretbeli különbséget nem a fehérje eltérő glikoziláltsága okozza.
- (5) A *CCW7/PIR2/HSP150* gén analízisével kimutattam, hogy a hártaképző élesztőgombák esetében a Pir2 fehérje kisebb mérete a gén kisebb méretére vezethető vissza, valamint a gén szekvencia analízisével megállapítottam, hogy a *PIR2* gén ismétlődő régiójában a laboratóriumi *S. cerevisiae* törzshöz képest három ismétlődő szakasz hiányzik. A *PIR2* génre heterozigóta TD04 hártaképző törzs meiotikus szegregánsait vizsgálva kimutattam, hogy az eltérő méretű allélok szegregálódtak. A gén szekvencia analízise arra utalt, hogy a két eltérő méretű allél a tandem ismétlődéseket tartalmazó gének replikációja során gyakori szálcsúszás eredménye.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A borászati tudományos szakirodalomban számos tanulmány foglalkozik a spanyol és francia sherry, valamint sherry-típusú boroknál a hártya alatti biológiai érlelésében részt vevő *Saccharomyces cerevisiae* hártyaképző („flor” vagy „velum”) törzsek tulajdonságaival. Vizsgálták ezen törzsek kariotípusát, a mtDNS polimorfizmusát és marker rDNS szekvencia jelenlétét. Kimutatták a flor élesztők hidrofób sejtfelszíni jellegét és a rossz spórázási képességet. Technológiai szempontból meghatározták jelentőségüket a borok összetételének és aromájának alakulásában az érlelés során. A magyarországi tokaji szamorodni érlelése során kialakuló élesztőhártyában jelenlévő élesztőgombákat az utóbbi szempont kivételével azonban eddig még nem vizsgálták.

Munkám során célul tűztam ki, hogy a tokaji szamorodni fahordós érlelése során a felszínen jelenlévő hárttyából élesztőgombákat izoláljak, az izolált élesztőgombákat azonosítsam és jellemezzem, valamint ezen tulajdonságokat összehasonlítsam a flor élesztők esetében leírt jellemzőkkel.

Munkám során 3 külföldi (spanyol, moldáv és kaliforniai) sherry élesztő törzset, valamint 23, a Tokaji Borvidékről származó, a szamorodni érlelésében részt vevő hárttyaképző élesztőt vizsgáltam. Eredményeim szerint valamennyi hárttyaképző élesztőgomba a *Saccharomyces cerevisiae* fajhoz tartozik az rDNS-RFLP analízis segítségével végzett molekuláris identifikálás alapján. A szamorodni törzsek többsége (87 %-a) az rDNS ITS1 régiójának heteroduplex analízise szerint dimorfikus rDNS-sel rendelkezik. Tartalmazzák mind a *S. cerevisiae* S288c szekvencia adatbankban megtalálható rDNS-t (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/seqTools>), mind a Fernandez-Espinar és mtsi. (2000) által leírt, a sherry flor élesztőkre jellemző 24 bp deléciós rDNS-t. A két különböző típusú rDNS mindkét homológ kromoszómán kombinációban fordul elő, mivel a vizsgált törzsnél meiosis során nem szegregálódtak. Emellett a törzsek nagyfokú genomikai hasonlóságára utal, hogy RAPD mintázataik 100 %-os azonosságot mutatnak.

A szamorodni hárttyából izolált *S. cerevisiae* élesztő törzsek összetétele fiziológiai szempontból nagyfokú hasonlóságot mutatnak a sherry és sherry-típusú borok felületén található élesztőhártya élesztőivel a szacharóz, maltóz és galaktóz fermentációs képesség alapján. A tokaji izolátumok mindegyike képes spórázásra, habár jelentős az aberráns tetrádok aránya, valamint a spórák életképessége is kicsi (27 %). Általánosságban elmondható, hogy a tokaji törzsek a *Saccharomyces cerevisiae* által termelt K1, K2, K28 és KTA killer toxinra érzéketlenek, amely hozzájárulhat a törzseknek az erjedő borban való túléléséhez az esetlegesen toxintermelő borélesztő törzsek mellett. Továbbá elmondható, hogy teljes mértékben alkalmazkodtak a szamorodni borban fennálló

környezeti tényezőkhez, képesek akár 18 % etanol tartalom mellett is túlélni, azonban ilyen nagy etanol koncentráció esetében a hártaképzés már elmarad. A borok kis pH értéke ideális a hártaképzők szaporodásához, valamint a hártaképzés kialakításához. Annak ellenére, hogy az élesztőhártaképzés kialakulásának egyik feltétele a bor cukortartalmának alacsony szintre történő csökkenése (Cantarelli és Martini, 1969; Iimura et al, 1980a), az édes tokaji szamorodni érése során is kialakulhat egy vékony hártaképzés a bor felszínén. Eredményeim szerint a száraz és édes szamorodni borok felületéről származó izolátumok szaporodása és sejthozama nem mutat eltérést a különböző glükóz koncentrációk esetében, azonban a hártaképzés kezdete az édes borból származó izolátumok esetében kissé kitolódik.

A szamorodni hártaképző törzsek sejtfelszíne savas pH tartományban erősen hidrofób. Ez a nagy hidrofóbicitási érték nemcsak a hártaképzés során jellemző, hanem a szaporodás minden fázisában. A sejtek hidrofób tulajdonsága valószínűleg elsősorban a sejtfal hidrofób fehérjéinek tulajdonítható. A hidrofób jelleg mellett a törzsek elektron donor tulajdonsággal rendelkeznek. A törzsek képesek hidrofób kölcsönhatások kialakítására, ugyanis képesek nemcsak agar, de polisztirol és üveg felületéhez is hozzátapadni, invazív növekedést azonban nem mutatnak. Valószínű, hogy a hártaképzés kialakulásában is nagy szerepet játszanak a sejtek közötti hidrofób kölcsönhatások.

Különbséget kerestem a *S. cerevisiae* laboratóriumi törzsek és a hártaképző borélesztők sejtfal fehérjéi között. A hártaképző élesztőgombák kisebb, de azonos méretű Ccw7p/Pir2p/Hsp150p sejtfal fehérjét tartalmaznak, mint a laboratóriumi élesztőgomba törzsek, ami nem volt visszavezethető a fehérje glikoziláltságának eltérő szintjére. A Ccw7 fehérje kisebb méretét a kódoló gén rövidebb volta okozta. A hártaképző élesztőgombák génjének ismétlődő régiójából 3 ismétlődő szakasz hiányzik a *S. cerevisiae* S288c labortörzshöz képest. A hártaképző borélesztők többségében a *CCW7* gén mérete azonos, azonban egyes esetekben a tandem ismétlődéseket tartalmazó génekre jellemzően, rekombináció következtében eltérő méretű allélok voltak kimutathatók. A hártaképzőkkel ellentétben a nem-hártaképző borélesztő törzsek *CCW7* génje nagymértékű polimorfizmust mutat, valamint ezen törzsek gyakran heterozigóták erre a génre nézve. A borélesztők számos stressztényezőnek vannak kitéve, amelynek során többek között számos *HSP* (hő sokk fehérje) gén, mint pl. a *HSP150* (*CCW7*) indukálódik. A Ccw7 fehérje ismétlődő aminosav szekvenciájának szerepe van a sejtfal tömörségének kialakításában azáltal, hogy a β 1,3-glükánhoz való kapcsolódásukkal ezeket a molekulákat egymáshoz közelíteni vagy távolítani képesek. Ezenfelül kimutatták, hogy kis pH értékek estében a sejtfalban jelenlévő Ccw7 fehérje mennyisége megnő. További kutatás tárgyát képezheti, hogy a *CCW7* gén ismétlődő szekvenciáinak száma hatással van-e a sejtfal szerkezetére illetve erősségére hiperozmotikus, etanol vagy pH stressz esetében.

9. SUMMARY

Several research studies have been performed with the characterisation of the buoyant biofilm (so called “flor” or “velum”) forming *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains, which play an important role in the biological aging of Spanish and French sherry and sherry-type wines, respectively. Molecular characteristics like the karyotype analysis, polymorphism of mtDNA and the presence of a marker rDNA sequence of the flor strains have been widely studied. The strong cell surface hydrophobicity and the low spore forming ability of these yeast strains have been already determined. Technological significance of aging in the chemical composition and formation of aromatic compounds of sherry and sherry-type wines has been proved by several research groups. Except the last mentioned aspect, however, the film-forming yeasts involved in the biological aging of the Hungarian Tokaji Szamorodni wine have not been studied at all.

Main objectives of my research work were the isolation of yeasts from the velum of Tokaji Szamorodni, which is developing during aging of wine in oak barrels as well as the identification and characterization of the film-forming strains and comparison of the results obtained with the properties of foreign flor yeasts.

In my study three sherry flor yeasts (originated from Spain, Moldavia and California) and 23 ‘Szamorodni’ film-forming yeast strains (originated from Tokaj Wine District) were involved.

All of the investigated film-forming strains belonged to *Saccharomyces cerevisiae* according to the results obtained by molecular identification based on the rDNA-RFLP analysis. Most of the strains (87 %) possessed dimorphic rDNA as it has been proved by heteroduplex analysis of the rDNA-ITS1 region. The genomes of these strains contained two different alleles of rDNA. The DNA sequence of the first type of alleles was identical with that of deposited in the *S. cerevisiae* sequence databank (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/seqTools>) and the other type was identical with the sequence described by Fernandez-Espinar et al. (2000). The last mentioned sequence contains a 24 bp deletion. These two types of rDNA alleles were present in combination on each chromosome XII of the diploid cells, since the two types of rDNA alleles did not segregate during meiosis. Furthermore the high degree of genomic similarity of film-forming strains is represented by the 100 % identity of their RAPD patterns.

Physiological characteristics of *S. cerevisiae* yeasts originated from ‘Szamorodni’ film were highly similar to that found in the velum of sherry and sherry-type wines based on the sugar fermentation profiles. All the ‘Szamorodni’ isolates were able to sporulate, although the ratio of aberrant tetrads was high and the viability of the spores was very low (c.a. 27 %). The ‘Szamorodni’ strains were in general resistant to the K1, K2, K28 and KTA killer toxins of *S. cerevisiae* killer strains, which

could play an important role in surviving the presence of killer toxin producing yeasts during wine fermentation. The yeast strains highly adapted to the environmental conditions of Szamorodni wines, they were able to survive at 18 % ethanol content, but at this ethanol concentration the film formation failed. Despite the fact, that the depletion of sugar is a prerequisite of film-formation (Cantarelli and Martini, 1969; Iimura et al, 1980a), some of the ‘Szamorodni’ film strains are able to form a thin film on the surface of sweet Szamorodni wines. No differences were found in the growth and biomass yield of dry and sweet wine isolates at different glucose concentrations, but the beginning of film formation was a little bit delayed in the case of sweet wine isolates.

‘Szamorodni’ film-forming yeasts displayed high degree of cell surface hydrophobicity at acidic pH values. This high degree of hydrophobicity has been observed not only during film formation, but also in all growth phases. The strong hydrophobic property of the cells could be explained with the presence of hydrophobic cell wall proteins. In addition to the hydrophobic nature, the strains were characterized as having electron donor cell surface. The film-forming cells are able to get into hydrophobic interactions, as they showed adhesive growth on agar, polystyrene and glass surfaces, but they did not possess invasive growth property. It is highly probable that hydrophobic interaction between the attaching cells has a crucial role in the formation of a firm buoyant biofilm.

Comparing the cell wall proteins of laboratory and film-forming *S. cerevisiae* wine strains only one difference has been determined. The film-forming strains contained smaller but uniform Ccw7/Pir2/Hsp150 proteins, than the laboratory strains. This difference, however, was not the consequence of the decreased glycosylation level of the proteins. The reason of the smaller size of the Ccw7 protein was the presence of shorter coding gene. The repetitive region of the *CCW7* gene of the film-forming yeasts contained a deletion in comparison with the S288c *S. cerevisiae* laboratory strain. Majority of film-forming strains contained *CCW7* alleles of identical size, but in some cases different alleles could be detected, which were the consequences of high recombination frequency characteristic to the genes containing tandem repeats. In contrast to the film-forming strains the *CCW7* gene of the non film-forming wine yeast strains showed extended length polymorphism, moreover these last mentioned strains are often heterozygotic for this gene. The ‘Szamorodni’ wine yeasts are exposed to several stress factors, which induce many *HSP* (heat shock protein) genes, like the *HSP150* (*CCW7*) gene. The repetitive sequences found in the Ccw7 protein play an important role in the tightness of the cell wall by interconnecting the β 1,3-glucane molecules. Furthermore it has been proved that low pH values increase the amount of Ccw7 protein in the cell wall. It needs further investigation to clarify whether the number of the repetitive regions of the *CCW7* has any impact on the structure and strength of the cell wall under hyperosmotic, ethanol or pH stress conditions.

IRODALOMJEGYZÉK

- Alem M. A. S., Douglas L. J. (2004): Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1): 41-47
- Alexandre H., Bertrand F., Charpentier C. (1998): Ethanol induced yeast film formation with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Food Technology and Biotechnology*, 36(1): 27-30
- Alexandre H., Blanchet S., and Charpentier C. (2000) Identification of a 49-kDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in velum yeast which may be implicated in velum formation. *FEMS Microbiology Letters* 185, 147-150.
- Alexandre H., Rousseaux I, Charpentier C. (1994): Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*, 124: 17-22
- Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A. (2000): Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 30: 5-9
- Aranda A., del Olmo M. (2003): Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several *ALD* genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast*, 20: 747-759
- Aranda A., Querol A., del Olmo M. (2002): Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of *HSP* genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Archives of Microbiology*, 177: 304-312
- Baleiras Couto M. M., Eijssma B., Hofstra H., Huis in't Veld J. H. J., van der Vossen J. M. B. M. (1996): Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1): 41-46
- Ballou C. (1976): Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. *Advances in Microbial Physiology*, 14: 93-158
- Bandas E. L., Zakharov I. A., (1980): Induction of *rho*⁻ mutations in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. *Mutation Research*, 71: 193-199

- Barbe J. C., de Revel G., Bertrand A. (2002): Gluconic acid, its lactones, and SO₂ binding phenomena in musts from botrytized grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6408-6412
- Bareetseng A. S., Kock J. L. F., Pohl C. H., Pretorius E. E., Strauss C. J., Botes P. J., van Wyk P. W. J., Nigam S. (2004): Mapping 3-hydroxy oxylipins on ascospores of *Eremothecium sinicaudum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86: 363-368
- Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. (2000): Yeasts: Characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press
- Baron R., Mayen M., Merida J., Medina M. (1997): Changes in phenolic compounds and browning during biological ageing of sherry wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1682-1685
- Bayly J. C., Douglas L. M., Pretorius I. S., Bauer F. F., Dranginis A. M. (2005): Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 5: 1151-1156
- Bellon-Fontaine M.-N., Rault J., van Oss C. J. (1996): Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7: 47-53
- Bhatt R. K., Falck J. R., Nigam S. (1998): Enantiospecific total synthesis of a novel arachidonic acid metabolite 3-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Tetrahedron Letters*, 39: 249-252
- Bidenne C. B., Blondin S., Denquin S., Vezinhet F. (1992): Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 22: 1-7
- Botella M. A., Perez-Rodriguez I., Domecq B., Valpuesta V. (1990): Amino acids content of fino and oloroso sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41: 12-15
- Brandriss M. C., Magasanik B. (1979): Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*; enzyme induction by proline. *Journal of Bacteriology*, 140: 498-503
- Braus G. H., Grundmann O., Brückner S., Mösch H. U. (2003): Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 14: 4272-4284
- Briandet R., Meylheuc T., Maher C., Bellon-Fontaine M.-N. (1999): *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12): 5328-5333

- Budroni M., Giordano G., Pinna G., Farris G. A. (2000): A genetic study of natural flor strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated during biological ageing from Sardinian wines. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 657-662
- Budroni M., Zara S., Zara G., Pirino G., Mannazzu I. (2005): Peculiarities of flor strains adapted to Sardinian sherry-like wine ageing conditions. *FEMS Yeast Research*, 5: 951-958
- Cabib E., Bowers B. (1971): Chitin and yeast budding. Localization of chitin in yeast bud scars. *Journal of Biological Chemistry*, 246: 152-159
- Calleja G. B. (1994): Hooks, loops, and the shallow minimum: mechanistic aspects of yeast flocculation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2: 133-149
- Cantarelli C., Martini A. (1969): On the pellicle formation by "flor" yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 35(S): F35-6
- Cappellaro C., Baldermann C., Rachel R., Tanner W. (1994): Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active site of a- and alpha-agglutinin. *EMBO Journal*, 13: 4737-4744
- Cappellaro C., Hauser K., Mrsa V., Watzele M., Watzele G., Gruber C., Tanner W. (1991): *Saccharomyces cerevisiae* a- and alpha-agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO Journal*, 10: 4081-4088
- Cappellaro C., Mrsa V., Tanner W. (1998): New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces* and their involvement in mating. *The Journal of Bacteriology*, 180: 5030-5037
- Carrasco P., Querol A., del Olmo M. (2001): Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175: 450-457
- Castillo L. (1992): Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37: 647-651
- Castillo L., Marinez A. I., Garcera A., Elorza M. V., Valentín E., Sentandreu R. (2003): Functional analysis of the cysteine residues and the repetitive sequence of *Saccharomyces cerevisiae* Pir4/Cis3: the repetitive sequence is needed for binding to the cell wall β 1,3-glucan. *Yeast*, 20: 973-983
- Castor J. G. B., Archer T. E. (1957): Nutrient requirements for growth of the sherry flor yeast, *Saccharomyces beticus*. *Applied Microbiology*, 5(1): 56-60
- Castrejón F., Codón A. C., Cubero B., Benítez T. (2002): Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 462-467

- Charpentier C., Dos Santos A. M., Feuillat M. (2004): Release of macromolecules by *Saccharomyces cerevisiae* during ageing of French flor sherry wine “Vin jaune”. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 253-262
- Charpentier C., Feuillat M. (1993): Yeast autolysis. 225-245 p. In: Fleet G. H. (Szerk.): *Wine Microbiology and Biotechnology*. Switzerland: Harwood Academic Publishers
- Charpentier C., N’guyen van Long T., Bonaly R. C., Feuillat M. (1986): Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24: 405-413
- Clausen M. K., Christiansen K., Jensen P. K., Behnke O. (1974): Isolation of lipid particles from baker’s yeast. *FEBS Letters*, 43: 176-179
- Corte L., Lattanzi M., Buzzini P., Bolano A., Fatichenti F., Cardinali G. (2005): Use of RAPD and killer toxin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* strains typing. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 609-617
- Cortes M. B., Moreno J., Zea L., Moyano L., Medina M. (1998): Changes in aroma compounds of sherry wines during their biological aging carried out by *Saccharomyces cerevisiae* races *bayanus* and *capensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2389-2394
- Cortes M. B., Moreno J., Zea L., Moyano L., Medina M. (1999): Response of the aroma fraction in sherry wines subjected to accelerated biological aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:3297-3302
- Crowther R. F., Truscott J. H. L. (1955): Note on the growth of flor yeasts. *Canadian Journal of Agricultural Science*, 35(2): 211-212
- Cullen P. J., Sprague G. F. (2000): Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *PNAS*, 97(25): 13619-13624
- Daum G., Paltauf F. (1980): Triacylglycerols as fatty acid donors for membrane phospholipids biosynthesis in yeast. *Monatshefte für Chemie*, 111: 355-363
- de Barros L., Bellon M., Shirley J. R., Ganter P. F. (2002): Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Research*, 1: 323-331
- de Groot P. W. J., Ram A. F., Klis F. M. (2005): Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 657-675
- de Llanos R., Querol A., Pemán J., Gobernado M., Fernández-Espinar M. T. (2006): Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *International Journal of Food Microbiology*, 110: 286-290

- de Nobel J. G., Klis F. M., Priem J., Munnik T., van den Ende H. (1990): The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 6: 491-499
- Deák T. (2006): Mikrobiodiverzitás. Budapest: Aula Kiadó
- Delwart E. L., Shpaer E. G., Mullins J. I. (1995) Heteroduplex mobility assay for phylogenetic analysis. 154-160 p. In: Gelfand, D. H., Sninsky J. J. and Innis M. (Szerk.): *PCR strategies*. San Diego: Academic Press Inc.
- Dengis P. B., Rouxhet P. G. (1997): Surface properties of top- and bottom-fermenting yeast. *Yeast*, 13: 931-943
- Donèche B. J. (1994): Botrytized wines. 327-353 p. In: Fleet G. H. (Szerk.): *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur: Harwood Academic Publishers
- Eperjesi I. (1998): Természetes borok, tokaji borkülönlegességek. 205-207 p. In: Eperjesi I., Kállay M., Magyar I. (Szerk.): *Borászat*. Budapest: Mezőgazda kiadó
- Espinazo-Romeu M., Cantoral J. M., Matallana E., Aranda A. (2008): Btn2p is involved in ethanol tolerance and biofilm formation in flor yeast. *FEMS Yeast Research*, publikáció alatt
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. (1999): Identification of yeasts by RFLP analysis of the rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 329-337
- Esteve-Zarzoso B., Fernandez-Espinar M. T., Querol A. (2004): Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 151-158
- Esteve-Zarzoso B., Peris-Torán M. J., García-Maiquez E., Uruburu F., Querol A. (2001): Yeast population dynamics during the fermentation and biological ageing of sherry wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2056-2061
- Fabios M., Lopez-Toledano A., Mayen M., Merida J., Medina M. (2000): Phenolic compounds and browning in sherry wines subjected to oxidative and biological ageing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2155-2159
- Farris G. A., Sinigaglia M., Budroni M, Elisabetta M. (1993): Cellular fatty acid composition in film-forming strains of two physiological races of *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in Applied Microbiology*, 17: 215-219
- Fernandez-Espinar M. T., Barrio E., Querol A. (2003): Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, 20: 1213-1226

- Fernandez-Espinar M. T., Esteve-Zarzoso B., Querol A., Barrio E. (2000): RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 87-97
- Feuillat M., Charpentier C. (1982): Autolysis of yeasts in Champagne. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33: 6-13.
- Fidalgo M., Barrales R. R., Ibeas J. I., Jimenez J. (2006): Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103: 11228-11233.
- Field D., Wills C. (1998): Abundant microsatellite polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 1647-1652
- Fleet G. H. (1991): Cell wall. 199-277 p. In: Rose A. H., Harrison J. S. (Szerk.): *The Yeasts: Yeast Organelles*, vol. 4. London: Academic Press
- Fornachon J. C. M. (1953): Studies on the sherry flor. Adelaide: Australian Wine Board
- Freiberg K. J., Cruess W. V. (1955): A study of certain factors affecting the growth of flor yeast. *Applied Microbiology*, 3(4): 208-212
- Gentzsch M., Tanner W. (1996): The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO Journal*, 15: 5752-5759
- González S. S., Barrio E., Gafner J., Querol A. (2006): Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 6(8): 1221-1234
- Gonzales Techera A., Jubany S., Carrau F. M., Gaggero C. (2001): Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 71-75
- Guijo S., Mauricio J. C., Salmon J. M., Ortega J. M. (1997): Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'Flor' film ageing of dry sherry-type wines. *Yeast*, 13: 101-117
- Guillamón J. M., Barrio E., Huerta T., Querol A. (1994): Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 708-714

- Guo B., Styles C. A., Feng Q., Fink G. (2000): A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 12158-12163
- Harris S. G., Padilla J., Koumas L., Ray D., Phipps R. P. (2002): Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology*, 23: 144-150
- Henschke P.A. (1997): Wine yeast. 527-560 p. In: Zemmerman F. K. and Entian K. D. (Szerk.): *Yeast Sugar Metabolism*. Lancaster, PA: Technomic Publishing
- Hoffman C.S., Winston F. (1987): A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57: 267-272
- Howell K. S., Bartowsky E. J., Fleet G. H., Henschke P. A. (2004): Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 315-320
- Ibeas J. I., Jimenez J. (1997c): Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(1): 7-12
- Ibeas J. I., Lozano I., Perdignes F., Jimenez J. (1997a): Dynamics of flor yeast populations during the biological aging of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(1): 75-79
- Ibeas J. I., Lozano I., Perdignes F., Jimenez J. (1997b): Effects of ethanol and temperature on the biological aging of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(1): 71-74
- Iimura Y., Hara S., Otsuka K. (1980a): Cell surface hydrophobicity as a pellicle formation factor in film strain of *Saccharomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(6): 1215-1222
- Iimura Y., Hara S., Otsuka K. (1980b): Fatty acids as hydrophobic substance on cell surface of film strain of *Saccharomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(6): 1223-1229
- Inglede W. M., Magnus C. A., Solulski F. W. (1987): Influence of oxygen on proline utilization during wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38: 246-248
- Iserentant D. (1996): Practical aspects of yeast flocculation. *Cerevisia*, 21(3): 30-33
- Ishigami M., Nakagawa Y., Hayakawa M., Iimura Y. (2006): *FLO11* is the primary factor in flor formation caused by cell surface hydrophobicity in wild-type flor yeast. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70(3): 660-666
- Jakobson M. K., Bernofsky C. (1974): Mitochondrial acetaldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 350: 277-291
- Jimenez J., Benitez T. (1987): Genetic analysis of highly ethanol tolerant wine yeasts. *Current Genetics*, 12:421-428

- Jimenez J., Benitez T. (1988): Yeast cell viability in high temperature and ethanol depends on the mitochondrial genome. *Current Genetics*, 13: 461-469
- Johnston J. R., Baccari C., Mortimer R. K. (2000): Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Research in Microbiology*, 151: 583-590
- Kádár Gy., Eperjesi I., B.-Kovács L. (1975): Új borkülönlegesség készítése biológiai érleléssel. *Borgazdaság*, 23: 84-86
- Kállay M. (1998): Borászati kémia. 253-428 p. In: Eperjesi I., Kállay M., Magyar I. (Szerk.): *Borászat*. Budapest: Mezőgazda Kiadó
- Kang S., Choi H. (2005): Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* onto modified surfaces by poly (styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46: 70-77
- Kapteyn J. C., Montijn R. C., Vink R., de la Cruz J., Llobell A., Douwes J. E., Shimoi H., Lipke P. N., Klis F. M. (1996): Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β -1,3-/ β -1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology*, 6: 337-345
- Kapteyn J. C., ter Riet B., Blad S., de Nobel H., van den Ende H., Klis F. M. (2001): Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Molecular Biology*, 39(2): 469-479
- Kapteyn J. C., van Egmond P., Sievi E., van den Ende H., Makarow M., Klis F. M. (1999): The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and β 1,6-glucan-deficient mutants. *Molecular Biology*, 31(6): 1835-1844
- Kikuchi T., Shigetoshi K., Hisashi S., Arasuke N., Keisuke T., Hiroshi Y., Kenji H. (1983): Odorous Metabolites of Fungi, *Chaetomium globosum* KINZE ex FR. and *Botrytis cinerea* PERS. ex FR., and a Blue-green Alga, *Phormidium tenue* (MENEHINI) GOMONT. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 31(2): 659-663
- Kitagaki H., Shimoi H., Itoh K. (1997): Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tir1p/Srp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 249: 343-349
- Klingberg T. D., Lesnik U., Arneborg N., Raspor P., Jespersen L. (2008): Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. *FEMS Yeast Research*, 8: 631-640
- Klis F. M. (1994): Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast*, 10: 851-869

- Klis F. M., Boorsma A., de Groot W. J. (2006): Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23: 185-202
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002): Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 239-256
- Kock J. L. F., Strauss C. J., Pohl C. H., Nigam S. (2003): The distribution of 3-hydroxy oxylipins in fungi. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 71: 85-96
- Kock J. L. F., Strauss C. J., Pretorius E. E., Pohl C. H., Baretseng A. S., Botes P. J., van Wyk P. W. J. (2004): Revealing yeast spore movement in confined space. *South African Journal of Science*, 100: 237-240
- Kock J. L. F., van Wyk P. W. J., Venter P., Coetzee D. J., Smith D. P., Viljoen B. C., Nigam S. (1999): An acetylsalicylic acid-sensitive aggregation phenomenon in *Dipodascopsis uninucleata*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75: 261-266
- Kock J. L. F., Venter P., Smith D. P., van Wyk P. W. J., Botes P. J., Coetzee D. J., Pohl C. H., Botha A., Riedel K., Nigam S. (2000): A novel oxylipin-associated 'ghosting' phenomenon in yeast flocculation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77: 401-406
- Kollar R., Petrakova E., Ashwell G., Robbins P. W., Cabib E. (1995): Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 1170-1178
- Kollar R., Reinhold B. B., Petrakova E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J. C., Klis F. M., Cabib E. (1997): Architecture of the yeast cell wall. $\beta(1\rightarrow6)$ -glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan, and chitin *Journal of Biological Chemistry*, 272: 17762-17775
- Kuchin S., Vyas V. K., Carlson M. (2002): Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(12): 3994-4000
- Kurtzman C. P. (1992): rRNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships among yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 1-6
- Kurtzman C. P. (1993): Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNS sequence divergence. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63: 165-174
- Kurtzman C. P. (2003): Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhynchus*. *FEMS Yeast Research*, 4: 233-245

- Kurtzman C. P., Robnett C. J. (1991): Phylogenetic relationships among species of the genera *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*, 7: 61-72
- Kurtzman C. P., Robnett C. J. (1998): Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 331-371
- Lambrechts M. G., Bauer F. F., Marmur J., Pretorius I. S. (1996): Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 8419-8424
- Leber R., Zinser E., Zellnig G., Paltauf F., Daum G. (1994): Characterization of lipid particles of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10: 1421-1428
- Leeuw N. J., Kock J. L. F., Pohl C. H., Bareetseng A. S., Sebolai O. M., Joseph M., Strauss C. J., Botes P. J., van Wyk P. W. J., Nigam S. (2005): Oxylipin covered ascospores of *Eremothecium coryli*. *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 89(1): 91-97
- Le Jeune C., Lollier M., Demuyter C., Erny C., Legras J-L., Aigle M., Masneuf-Pomarède I. (2007): Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Research*, 7(4): 540-549
- Leoni, F., Gallimore, C. I., Green, J. and McLauchlin, J. (2003) A rapid method for identifying diversity within PCR amplicons using a heteroduplex mobility assay and synthetic polynucleotides application to characterisation of dsRNA elements associated with *Cryptosporidium*. *Journal of Microbiological Methods* 54, 95-103.
- Lewis T. A., Rodriguez R. J. Parks L. W. (1987): Relationship between intracellular sterol content and sterol esterification and hydrolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 921: 205-212
- Lipke P. N., Ovalle R. (1998): Minireview: Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *Journal of Bacteriology*, 180(15): 3735-3740
- Lo W. S., Dranginis A. M. (1996): *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *Journal of Bacteriol*, 178: 7144-7151
- Lo W. S., Dranginis A. M. (1998): The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 9: 161-171
- Lodder J. (1970): The Yeasts, a Taxonomic Study. Amsterdam: North-Holland Publishing Company

- Lu C. F., Kurjan J., Lipke P. (1994): A pathway of cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 4825-4833
- Lüthi H. R., Stoyla B., Moyer J. C. (1965): Continuous production of flor sherry from New York State wines. *Applied Microbiology*, 13(4): 511-514
- Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L. (1997): Yeast killer systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3): 369-400
- Magyar I. (1984): Sherryzásásnál alkalmazott élesztőgombák vizsgálata. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem. Doktori disszertáció
- Magyar I. (1998): Biológiai borérlelés hártaképző élesztőgombákkal. 515-519 p. In: Eperjesi I., Kállay M., Magyar I. (Szerk.): *Borászat*. Budapest: Mezőgazda Kiadó
- Magyar I., B.-Kovács L., Kádár Gy., Eperjesi I. (1983): A biológiai borérlelés újabb eredményei. *A Kertészeti Egyetem 1983. évi közleményei*, 164-172
- Mannazzu I., Simonetti E., Marinangeli P., Guerra E., Budroni M., Thangavelu M., Clementi F. (2002): *SEDI* gene length and sequence polymorphisms in feral strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11): 5437-5444
- Maráz A., Pomázi A., Magyar I., Erdélyi B. (1999): Molecular diversity of filmforming wine yeasts. Poster on the 9th European Congress on Biotechnology, Bruxelles, Belgium. 11-15th July, 1999. Abstract: ECB 9/2360
- Marinangeli P., Angelozzi D., Ciani M., Clementi F., Mannazzu I. (2004a): Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterisation. *FEMS Yeast Research*, 4: 427-435
- Marinangeli P., Clementi F., Ciani M., Mannazzu I. (2004b): *SEDI* polymorphism within the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Research*, 5: 73-79
- Martinez P., Codón A. C., Pérez L., Benítez T. (1995): Physiological and molecular characterization of flor yeasts: Polymorphism of flor yeast populations. *Yeast*, 11: 1399-1411
- Martinez P., Pérez L., Benítez T. (1997a): Evolution of flor yeast population during the biological ageing of fino Sherry wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 160-168
- Martinez P., Pérez L., Benítez T. (1997c): Factors which affect velum formation by flor yeasts isolated from sherry wines. *Systematic and Applied Microbiology*, 20: 154-157
- Martinez P., Rodríguez L. P., Benítez T. (1997b): Velum formation by flor yeasts isolated from sherry wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(1): 55-62

- Martínez P., Valcárcel M. J., Pérez L., Benítez T. (1998): Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: By-products and aroma compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3): 240-250
- Masneuf I., Hansen J., Groth C., Piškur J., Dubourdieu D. (1998): New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Applied Environmental Microbiology*, 64: 3887-3892
- Masy C. L., Henquinet A., Mestdagh M. M. (1992): Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*: inhibition by sugars. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 1298-1306
- Mauricio J. C., Guijo S., Ortega J. M. (1991): Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42: 301-308
- Mauricio J. C., Valero E., Millan C., Ortega J. M. (2001): Changes in nitrogen compounds in must and in wine during fermentation and biological ageing by flor yeasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3310-3315
- Mercier-Bonin M., Ouazzani K., Schmitz P., Lorthois S. (2004): Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 271: 342-350
- Mesa J. J., Infante J. J., Rebordinos L., Cantoral J. M. (1999): Characterization of yeasts involved in the biological ageing of sherry wines. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 32: 114-120
- Mesa J. J., Infante J. J., Rebordinos L., Sánchez J. A., Cantoral J. M. (2000): Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 15-21
- Mishra P., Prasad R. (1989): Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 294-298
- Montrocher R., Verner M.-C., Briolay J., Gautier C., Marmeisse R. (1998): Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 295-303
- Moreno J. A., Zea L., Moyano L., Medina M. (2005): Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control*, 16: 333-338
- Mortensen H., Dupont K., Jespersen L., Arneborg N. (2007): The Flo11p-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain background S288c can adhere to plastic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60: 131-134

- Mortimer R. K., Romano P., Suzzi G., Polsinelli M. (1994): Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast*, 10: 1543-1552
- Moukadiri I., Zueco J. (2001): Evidence for the attachment of Hsp150/Pir2 to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* through disulfide bridges. *FEMS Yeast Research*, 1: 241-245
- Mrsa V., Ecker M., Cappellaro C., Teparic R., Tanner W. (1999): *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins. *Food technology and Biotechnology*, 37(1): 21-27
- Mrsa V., Seidl T., Gentzsch M., Tanner W. (1997): Specific labeling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13: 1145-1154
- Mrsa V., Tanner W. (1999): Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast*, 15: 813-820
- Naumov G. I. (1996): Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 17: 295-302
- Naumov G. I., James S. A., Naumova E. S., Louis E. J., Roberts I. N. (2000): Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1931-1942
- Naumov G. I., Naumova E. S., Lantto R. A., Louis E. J., Korhola M. (1992): Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. *Yeast*, 8: 599-612
- Naumov G. I., Naumova E. S., Michels C. A. (1994): Genetic-variation of the repeated *mal* loci in natural populations of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*, 136: 803-812
- Naumova E. S., Bulat S. A., Mironenko N. V., Naumov G. I. (2003b): Differentiation of six sibling species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex by multilocus enzyme electrophoresis and UP-PCR analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83: 155-166
- Naumova E. S., Korshunova I. V., Jespersen L., Naumov G. I. (2003a): Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research*, 3: 177-184

- Nguyen H-V., Gaillardin C. (2005): Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and teh hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. *FEMS Yeast Research*, 5: 471-483
- Olicio R., Almeida C. A. S., Seuánez H. N. (1999): A rapid method for detecting and distinguishing clinically important yeasts by heteroduplex mobility assays (HMAs). *Molecular and Cellular Probes*, 13: 251-255
- Panyik G., Kádár Gy., Eperjesi I. (1987): A biológiai borérlelés szabályozása. *A Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem közleményei*, 51: 269-277
- Peinado R. A. Mauricio J. C., Ortega J. M., Medina M., Moreno J. J. (2003b): Changes in gluconic acid, polyols and major volatile compounds in sherry wine during aging with submerged flor yeast cultures. *Biotechnology Letters*, 25: 1887-1891
- Peinado R. A., Moreno J. J., Ortega J. M., Mauricio J. C. (2003a): Effect of gluconic acid consumption during simulation of biological aging of sherry wines by a flor yeast strains on the final volatile compounds. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6198-6203
- Pelletier C., Bouley C., Cayuela C., Bouttier S., Bourlioux P., Bellon-Fontaine M.-N. (1997): Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5): 1725-1731
- Perkátai K., Szamos J., Maráz A. (2003): Characterisation of a new type of killer yeast (KTA1) isolated from botrytized wine. *23rd International Specialised Symposium on Yeasts*, Book of Abstracts: 203
- Pham T., Guichard E., Charpentier C. (1996): Quantification of sotolon in French „Vins Jaunes” during ageing under the yeast film. *Sciences des Aliments*. 16: 281-289.
- Querol A., Fernandez-Espinar M. T., del Olmo M., Barrio E. (2003): Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 3-10
- Rainieri S., Zambonelli C., Hallsworth J. E., Pulvirenti A., Giudici P. (1999): *Saccharomyces uvarum*: a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters*, 177: 177-185
- Rainieri S., Zambonelli C., Kaneko Y. (2003): *Saccharomyes sensu stricto*: Systematics, genetic diversity and evolution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(1): 1-9

- Ramos J. P., Valente P. de Souza R. A., Rosa C. A., Leoncini O. (2001): Heteroduplex mobility assay of the D1/D2 region of the 26S rDNA for differentiation of *Saccharomyces* species. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 206-210
- Reed G., Nagodawithana T. W. (1991): Wine yeast. 151-224 p. In: *Yeast technology*. New York: Van Nostrand Reinhold
- Reynolds T. B., Fink G. R. (2001): Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291: 878-881
- Ristow H., Seyfarth A., Lochmann E. R. (1995): Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutation Research*, 326: 165-170
- Roberts R. L., Fink G. R. (1994): Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental program sin the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & Development*, 8: 2974-2985
- Romano P., Suzzi G., Vannini L. (1994): Relationship between foaming and flocculence in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2: 511-515
- Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. (1980): Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 29-33
- Roy A., Lu C. F., Marykwas D. L., Lipke P. N., Kurjan J. (1991): The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Molecular and Cellular Biology*, 11: 4196-4206
- Rozes N., Larue F., Ribéreau-Gayon P. (1988): Effect of a variation of grape must temperature on the fermentative ability and the neutral lipid content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 10: 821-824
- Russo P., Kalkkinen N., Sareneva H., Paakkola J., Makarow M. (1992): A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 3671-3675
- Saigal D., Cunningham S. J., Farrés J., Weiner H. (1991): Molecular cloning of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene of *Saccharomyces cerevisiae* by genetic complementation. *Journal of Bacteriol*, 173: 3199-3208
- Sampermans S., Mortier J., Soares E. V. (2005): Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 525-531)

- Sancho E. D., Hernandez E., Rodriguez-Navarro A. (1986): Presumed sexual isolation in yeast populations during production of sherrylike wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2): 395-397
- Santa Maria J., Vidal D. (1973): Genetic control of “flor” formation by *Saccharomyces*. *Journal of Bacteriology*, 113(2): 1078-1080
- Schaffner G., Matile P. (1981): Structure and composition of baker’s yeast lipid globules. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 176: 659-666
- Schekman R., Brawley V. (1979): Localized deposition of chitin on the yeast cell surface in response to mating pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 645-649
- Shimizu K. (1993): Killer yeasts. 243-265 p. In: Fleet G. H. (Szerk.): *Wine Microbiology and Biotechnology*. Chur: Harwood Academic Publishers
- Shimoi H., Kitagaki H., Ohmori H., Iimura Y., Ito K. (1998): Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *The Journal of Bacteriology*, 180: 3381-3387
- Sipiczki M. (2002): Taxonomic and physiological diversity of *Saccharomyces bayanus*. 53-69 p. In Ciani M. (eds.): *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Kerala: Research Signpost
- Sipiczki M., Romano P., Lipani G., Miklos I., Antunovics Z. (2001): Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 97-105
- Smit G., Straver M. H., Lugtenberg B. J. J., Kijne J. W. (1992): Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11): 3709-3714
- Sogin M. L. (1990): Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. 307-315 p. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Szerk.): *PCR Protocols (A guide to methods and applications)*. San Diego: Academic Press Inc.
- Stanley G. A., Pamment N. B. (1992): Transport and intracellular accumulation of acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 42: 24-29
- Stodola F. H., Deinema M. H., Spencer J. F. T. (1967): Extracellular lipids. *Bacteriological Reviews*, 31: 194-213
- Stratford M. (1989): Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Seventh International Symposium on Yeasts*, S441-S445
- Stratford M. (1994): Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast*, 10: 1741-1752

- Stratford M., Assinder S. (1991): Yeast flocculation: Flo1 and New Flo phenotypes and receptor structure. *Yeast*, 7: 559-574
- Strauss C. J., Kock J. L. F., van Wyk P. W. J., Lodolo E. J., Pohl C. H., Botes P. J. (2005): Bioactive oxylipins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(3): 304-308
- Straver M. H., Aar C. V. D., Smit G., Kijne J. W. (1993): Determination of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort. *Yeast*, 9: 527-532
- Suzzi G., Romano P., Vannini L. (1994): Cell surface hydrophobicity and flocculence in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 2: 505-510
- Terashima H., Hamada K., Kitada K. (2003): The localisation change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI-associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function. *FEMS Microbiology Letters*, 218: 175-180.
- Thuriaux P. (2004): La régulation métabolique chez *Saccharomyces cerevisiae*. 81-102 p. In: *Les organismes modèles: La levure*. Paris: Éditions Belin
- Toh-e A., Yasunaga S., Nisogi H., Tanaka K., Oguchi T., Matsui Y. (1993): Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast*, 9: 481-494
- Valente P., Gouveia F. C., de Lemos G. A., Pimentel D., van Elsas J. D., Mendonça-Hagler L. C., Hagler A. N. (1996): PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 137: 253-256
- Valentin E., Herrero W., Pastor J. F. I., Sentandreu R. (1984): Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 130: 1419-1428
- Valero E., Millán C., Ortega J. M. (2002): Changes in the lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* race *capensis* (G-1) during alcoholic fermentation and flor film formation. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 35: 593-599
- van der Mei H. C., Bos R., Busscher H. J. (1998): A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 11: 213-221
- van der Mei H. C., de Vries J., Busscher H. J. (1993): Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of thermophilic dairy Streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(12): 4305-4312

- van der Rest M. E., Kamminga A. H., Nakano A., Anraku Y., Poolman B., Konings W. N. (1995): The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. *Microbiological Reviews*, 38: 1069-1073
- van der Vaart, J. M., Caro L. H. P., Chapman J. W., Klis F. M., Verrips C. T. (1995): Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177(11): 3104-3110
- van der Westhuizen T. J., Augustyn O. P. H., Pretorius I. S. (1999): The value of long-chain fatty acid analysis, randomly amplified polymorphic DNA and electrophoretic karyotyping for the characterization of wine yeast strains. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 20(1): 3-10
- van Dyk D., Hansson G., Pretorius I. S., Bauer F. F. (2003): Cellular differentiation in response to nutrient availability: the repressor of meiosis, Rme1p, positively regulates invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 165: 1045-1058
- van Dyk M. S., Kock J. L. F., Botha A. (1994): Hydroxy long-chain fatty acids in fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 495-504
- van Oss C. J., Chaudhury M. K., Good R. J. (1988): Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*, 88: 927
- van Uden N. (1985): Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Annual Reports on Fermentation Processes*, 8: 11-58
- Vaughan-Martini A., Martini A. (1998): *Saccharomyces* Meyen ex Reess. 358-371 p. In: Kurtzman C. P., Fell J. W. (Szerk.): *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4th ed. Amsterdam: Elsevier Science
- Verstrepen K. J., Jensen A., Lewitter F., Fink G. R. (2005): Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nature Genetics*, 37: 986-990
- Verstrepen K. J., Klis F. M. (2006): Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, 60(1): 5-15
- Vezinhet F., Blondin B., Hallet J. N. (1990): Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32: 568-571
- Wang X., Mann C. J., Bai Y., Ni L., Weiner H. (1998): Molecular cloning, characterization, and potential roles of cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriol*, 180: 822-830

- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531-6535
- Yamamoto N., Yamamoto N., Amemiya H., Yokomori Y., Shimizu K., Totosuka A. (1991): Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42: 358-363
- Yao, H., Fang. M., Zhao, W., Duan, F., Lin, L., Chen, C. and Guo, H. (2002) Identification of genetic variation among Dengue Virus DEN-4 isolates with Heteroduplex analysis. *Dengue Bulletin* 26, 118-124.
- Yeh L-CC., Lee J. C. (1991): Higher-order structure of the 5.8S rRNA sequence within the yeasts 35S precursor ribosomal RNA synthesized *in vitro*. *Journal of Molecular Biology*, 217: 649-659
- Zacharius R. M., Zell T.E., Morrison J.H. and Woodlock J.J. (1969): Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 30(1):148-52
- Zara S., Bakalinsky A. T., Zara G., Pirino G., Demontis M. A., Budroni M. (2005): *FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2934-2939.
- Zea L., Moyano L., Moreno J., Cortes B., Medina M. (2001): Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chemistry*, 75: 79-84
- Zinser E., Paltauf F., Daum G. (1993): Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *Journal of Bacteriology*, 175: 2853-2858
- Zoller P., Redila-Flores T. (Bio-Rad Laboratories): Heteroduplex analysis of cystic fibrosis samples on the DCode™ system. US/EG Bulletin 2105
- Zuzuarregui A., del Olmo M. (2004): Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 271-280

Internet oldalak:

http://commons.wikipedia.org/wiki/Image:Budding_yeast_Lifecycle.png

<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/seqTools>

<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>

<http://www.magyarborokhaza.hu/tokaj.php>

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Maráz Annának a lehetőségért, hogy a Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszéken készíthettem el doktori munkámat, valamint a segítségéért és szakmai támogatásáért a doktorandusz éveim alatt és aztúán is.

Szeretném megköszönni Dr. Magyar Ildikónak, hogy rendelkezésemre bocsátotta hártvaképző borélesztő izolátumait, amelyeket így bevonhattam a vizsgálataimba.

Köszönöm Vladimir Mrša professzor úrnak (Zágrábi Egyetem, Biokémia Tanszék), hogy tanszékén lehetőséget nyújtott a fehérjevizsgálatok elvégzésére és Igor Stuparević doktorandusz hallgatónak, hogy bevezetett a fehérjékkel való munka rejtelmeibe.

Köszönetet mondanék kollégáimnak támogatásukért, elsősorban Belák Ágnesnek, aki nemcsak szakmai tanácsaival, hanem emberileg is támogatott az évek alatt.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom édesanyámnak és édesapámnak, akik soha nem vcsztették el a belém vetett bizalmukat.

„A legfontosabb dolog: nem szabad abbahagyni a kérdezősködést.”

(Albert Einstein)