

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

Kén-anyagcserében sérült szelenát rezisztens

***Schizosaccharomyces pombe* mutánsok előállítása és vizsgálata**

Doktori értekezés

Bánszky Luca

Budapest
2004

A doktori iskola

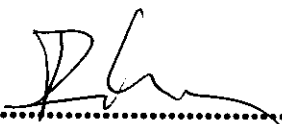
megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

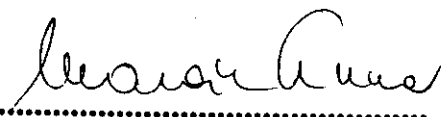
tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Fekete András, DSc.
egyetemi tanár
BCE, Élelmiszertudományi Kar,
Fizika - Automatika Tanszék

Témavezető: habil. Maráz Anna, CSc.
egyetemi tanár
BCE, 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, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.


.....
Az iskolavezető jóváhagyása


.....
A témavezető jóváhagyása

„Míg élsz, egyre tanulj és soha abba ne hagyd”

(Seneca)

Tartalomjegyzék

	oldalszám
1. Bevezetés	1
2. Irodalmi összefoglalás	5
2.1. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	5
2.1.1. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i> rendszertani besorolása	5
2.1.2. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i> életciklusa	6
2.1.3. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i> genomja	7
2.2. Molekuláris módszerek alkalmazása gombák rendszerezésében, identifikálásában és tipizálásában	8
2.2.1. RAPD-PCR analízis	9
2.2.2. A riboszómális DNS RFLP analízise ("ribotipizálás")	10
2.3. A <i>Schizosaccharomyces pombe</i> malo-etanolos fermentációja	11
2.3.1. Borok savtartalmának csökkentése malo-etanolos fermentációval	14
2.4. Az élesztőgombák kénforrás metabolizmusa és a kéntartalmú vegyületek bioszintézise	16
2.4.1. Kénvegyületek az élesztőgombákban és a szaporodás kénforrás igénye	16
2.4.2. A kénvegyületek felvétele	17
2.4.2.1. A szerves kénvegyületek transzportja	17
2.4.2.2. A szerves kénvegyületek transzportja	18
2.4.3. A kénvegyületek asszimilációja és a kéntartalmú vegyületek bioszintézise	19
2.4.3.1. A szulfát redukciója	19
2.4.3.2. A cisztein és metionin bioszintézise	22
2.4.3.3. Transz-szulfurilációs anyagcsereút hiánya a <i>Schizosaccharomyces pombe</i> -ban	23
2.4.4. A kén metabolizmus szabályozása	24
2.4.5. Szelenát rezisztencia és a szulfát hasznosítási képesség összefüggése	25
2.4.6. <i>Saccharomyces</i> élesztőgombák kénhidrogén termelésének szabályozása molekuláris klónozással	27
2.5. A borok kéntartalmú illékony vegyületei	28
2.5.1. A kénhidrogén és egyéb káros kénvegyületek termelődése az erjedés során	31
2.5.1.1. Az élesztő genetikai adottsága	31
2.5.1.2. Az élesztő nitrogén ellátottsága	31
2.5.1.3. Elemi kén illetve egyéb kéntartalmú szermaradványok a mustban	33
2.5.1.4. A kénhidrogénes aromahiba eltávolítása borból	35
3. Célkitűzések	37
4. Anyagok és módszerek	39
4.1. Törzsek	39
4.2. Táptalajok, oldatok	41
4.3. Módszerek	43
4.3.1. Genomiális DNS izolálás	43

4.3.2. RAPD-PCR analízis	43
4.3.3. Ribotipizálás	44
4.3.4. A RAPD-PCR analízis és ribotipizálás adatainak feldolgozása és kiértékelése.....	45
4.3.5. Szelenát minimális gátló koncentrációjának meghatározása.....	45
4.3.6. Kromát minimális gátló koncentrációjának meghatározása.....	46
4.3.7. Mutagénkezelés UV-besugárzással, túlélési görbe felvétele, mutánsok izolálásához megfelelő mutagén dózis meghatározása	46
4.3.8. Szelenát rezisztens mutánsok előállítása UV besugárzással	46
4.3.9. Mutagénkezelés kémiai mutagénekkel, túlélés meghatározása.....	47
4.3.10. Szelenát rezisztens mutánsok genetikai stabilitásának vizsgálata	47
4.3.11. Szelenát rezisztens mutánsok szulfát hasznosításának vizsgálata	47
4.3.12. Kromát rezisztencia vizsgálata.....	48
4.3.13. Ivaros hibridizáció.....	48
4.3.14. Protoplasztfúzió és random spóraanalízis	49
4.3.15. Kénforrás hasznosítás vizsgálata.....	50
4.3.16. Szelen bioakkumuláció mérése	50
4.3.17. Élesztősejtek szulfát felvételének izotópos mérése	51
4.3.18. Kénhidrogén termelés vizsgálata	51
4.3.19. Almasavtartalom meghatározása enzimes UV teszttel.....	53
4.3.20. Aromaprofil vizsgálat GC-MS technikával.....	53
4.3.21. Statisztikai módszerek vizsgálati eredmények kiértékelésére	56
5. Kísérleti eredmények.....	57
5.1. <i>Schizosaccharomyces</i> genus-hoz tartozó törzsek molekuláris vizsgálata.....	57
5.1.1. RAPD-PCR analízis	57
5.1.2. Ribotipizálás	64
5.2. Kén asszimilációban sérült <i>Schiz. pombe</i> mutánsok izolálása és vizsgálata	66
5.2.1. Szelenát rezisztens mutánsok indukciója	66
5.2.1.1. A mutánsok szelektálásához megfelelő szelenát koncentráció meghatározása	66
5.2.1.2. Mutánsok indukciójához megfelelő UV sugárdózis meghatározása	67
5.2.1.3. Szelenát rezisztens törzsek izolálása	67
5.2.1.4. Szelenát rezisztens mutánsok szelenát toleranciájának vizsgálata.....	68
5.2.2. Szelenát rezisztens <i>Schiz. pombe</i> mutánsok szulfát hasznosításának vizsgálata	69
5.2.3. Szelenát rezisztens izolátumok komplementációjának vizsgálata.....	69
5.2.3.1. Kromát érzékenység illetve rezisztencia vizsgálata.....	70
5.2.3.2. Szelenát rezisztens mutáns törzsek komplementációs analízise ivaros hibridizációval.....	70
5.3. Vad típusú és szelenát rezisztens <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mutánsok kénforrás hasznosítása	72
5.3.1. Szervetlen kénvegyületek hasznosítása	72
5.3.2. Szerves kénvegyületek hasznosítása	73

5.4. Szelenát rezisztens mutánsok szulfát transzportjának vizsgálata	76
5.4.1. Vad és szelenát rezisztens mutánsok ³⁵ S szulfát felvétele.....	76
5.4.2. Szelen bioakkumuláció vad és szelenát rezisztens törzsnél	79
5.5. Szelenát rezisztens és vad típusú <i>Schiz. pombe</i> törzsek erjedési illékony komponenseinek és almasavbontásának összehasonlítása mikrovínifikációs körülmények között	80
5.5.1. Vad típusú és mutáns törzsek kénhidrogén termelésének vizsgálata	80
5.5.1.1. Vad és mutáns törzsek kénhidrogén termelésének szűrése ólomacetátos módszerrel	80
5.5.1.2. Vad és mutáns törzsek kén hidrogén termelésének mérése táptalajban, mustban és borban fotometriás módszerrel.....	82
5.5.2. Vad típusú és mutáns törzsek által termelt illékony komponensek	84
5.5.3. Almasavbontás vizsgálata a szelenát rezisztens mutáns törzsekkel	87
5.5.4. Vad és mutáns törzsekkel kezelt borok érzékszervi vizsgálata	89
6. Eredmények értékelése, következtetések	91
6.1. Genotipizálási vizsgálatok.....	91
6.2. Szulfát asszimilációban sérült szelenát rezisztens mutánsok izolálása és analízise	93
6.3. Szelenát rezisztens és vad típusú <i>Schiz. pombe</i> törzsek kénhidrogén termelésének, erjedési aromaspektrumának és almasavbontásának összehasonlítása mikrovínifikációs körülmények között.....	98
7. Új tudományos eredmények	101
7.1. Új tudományos eredmények.....	101
7.2. Az eredmények hasznosítási és továbbfejlesztési lehetőségei.....	102
8. Összefoglalás.....	103
9. Summary	107
Irodalomjegyzék.....	111
Mellékletek.....	123

1. Bevezetés

Louis Pasteur a XIX. század második felében elsőként bizonyította, hogy a must alkoholos erjedését élesztőgombák tevékenysége okozza. Azóta egyre több tudományos ismeret gyűlt össze a bor alkoholos erjedésének körülményeiről, a szőlő és a must mikrobiotájáról, a borkészítés folyamata során lejátszódó biokémiai reakciókról és ezek befolyásáról a bor érzékszervi jellemzőire. A must borrá történő „biokonverziója” már régen nem az az egyszerű élesztős fermentáció, amire Pasteur mintegy 140 évvel ezelőtt rávilágított.

Az elmúlt 30-35 év fejlődése világosan mutatja, hogy a jó minőségű borok előállítása („gyártása”) egy összetett ökológiai, mikrobiológiai és biokémiai eljárás, amely számos mikroorganizmus tevékenységének az eredménye. Élesztőgombák, tejsavbaktériumok, ecetsavbaktériumok illetve esetenként egyéb baktérium fajok (*Bacillus*, *Clostridium* és *Streptomyces*) is befolyásolják a termék minőségét. Tovább „bonyolítják” a helyzetet és mutatnak rá a folyamat komplexitására a killer élesztők és a tejsav-, illetve ecetsavbaktériumok bakteriofágjai (Fleet, 1993).

Napjainkra a borászatban kialakult erős hagyományok, empirikus tapasztalatok és a borászati technológiában felhalmozódott ismeretanyag, valamint a modern természettudomány, a molekuláris biológia, a genetika, illetve a biotechnológia, fermentációs technológia, enzimes technológiák és a géntechnológia adta lehetőségek kihasználásával új távlatok nyíltak a borászat fejlődésében, ezek által egyre jobban tervezhető-irányítható folyamatok válnak lehetővé a minél magasabb minőségi követelményeknek megfelelő termék előállítása érdekében. Mindezek mára nagymértékben befolyásolják a borkészítés gyakorlatát.

A szőlő, a must, valamint a bor sokféle szerves savat tartalmaz, amelyek mennyisége és összetétele meghatározó szerepet játszik a bor érzékszervi tulajdonságainak - elsősorban az íz és illat - kialakításában. A must illetve a bor szervessav tartalma nagymértékben függ a szőlő fajtájától, érésének körülményeitől (talajadottságok, éghajlati jellemzők), az évjárat időjárási viszonyaitól, továbbá a fermentáció biokémiájától. A mustban a szerves savak közül a legnagyobb koncentrációban borkősav és almasav található, amelyek a szőlő érése során keletkeznek. A mustnak megfelelően, a bor két fő savkomponense is az almasav és a borkősav. Hűvös éghajlaton a mustok almasav tartalma nagyon magas lehet, ami erősen savas bort eredményez. Ilyenkor kívánatos lehet a magas savtartalom csökkentése harmónikusabb íz kialakítása érdekében. Míg a borkősav leköthető, az almasavat csak biológiai úton, egy igen

érzékeny eljárással, – a malo-laktikus fermentációval (MLF) – tudják eltávolítani, vagy mennyiségét csökkenteni.

A széles körben elterjedt malo-laktikus fermentáció során az almasavat tejsavbaktériumokkal tejsavvá – egy gyengébb savvá – alakítják, miközben szén-dioxid szabadul fel (Lafon-Lafourcade, 1983). A MLF rendszerint az alkoholos fermentációt követően zajlik, de előfordul azzal párhuzamosan is. Három szempontból van jelentősége: (1) savcsökkentés, (2) aroma módosítás, (3) mikrobiológiai stabilizálás.

A kétértékű almasav egyértékű tejsavvá való degradációja csökkenti a bor savasságát, növeli a pH-t. Fontos eljárás a hidegebb éghajlaton termesztett szőlők esetében, ahol nagyon gyakori a magas borkősav- és almasav-tartalom.

A folyamat nagy gondosságot igényel, nehezen irányítható. A tejsavbaktériumok szaporodását legfőbb mértékben a következő tényezők befolyásolják: pH, etanol tartalom, hőmérséklet, tejsav koncentráció, élesztő anyagcseretermékek gátló hatása, bakteriofágok jelenléte, tápanyag ellátottság, növekedést gátló anyagok (pl. szulfit) jelenléte. Ezek pontos szabályozása és kézben tartása fontos a fermentációhoz szükséges jó szaporodás eléréséhez.

A *Schizosaccharomyces* genuszba tartozó élesztők a szőlőmustban természetesen előforduló olyan élesztők, melyek a hagyományos borászati eljárások során nem szaporodnak el. A természetből izolálhatók olyan *Schiz. pombe* törzsek, amelyek nagy hatásfokkal metabolizálják az almasavat a malo-etanolos fermentáció (MEF) során, melyben az almasavat etanollá és CO₂-dá bontják (Dittrich, 1964).

Az MEF biokémiai mechanizmusa a hagyományos borélesztőben, a *Saccharomyces cerevisiae*-ben is létezik, de míg a *S. cerevisiae* az almasavat passzív transzporttal (Salmon, 1987), addig a *Schiz. pombe* aktív transzporttal (Osothsilp és Subden, 1986a) veszi fel. A malát transzport a *Schiz. pombe*-ben az aktív transzport miatt a koncentrációgradiens ellenében is lejátszódik, ezért a körülmények optimalizálásával a *Schiz. pombe* hatékony, akár a bor vagy must teljes almasavtartalmának lebontásra is képes.

A *Schiz. pombe* törzsek a jó almasavbontó aktivitás mellett a tejsavbaktériumokkal szemben még számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek: kiváló sav- és SO₂-tűrés, könnyű szaporíthatóság, egyszerű törzsfenntartás.

A *Schiz. pombe*-val való MEF gyakorlati alkalmazásának vannak azonban nehézségei is:

- az élesztő gyenge etanolos erjesztése,
- egyes törzsek gyenge alkohol toleranciája,
- a fermentáció ipari méretekben történő megvalósítása,
- a sejtek tenyésztése, majd eltávolítása a fermentációt követően,
- továbbá súlyos gondot jelent a *Schizosaccharomyces* fajok által termelt nem kívánatos aromaanyagok megjelenése (Benda és Schnitt, 1969; Carre et al., 1983). Elsősorban kén-hidrogén, de az egyéb kéntartalmú vegyületek (pl. merkaptán vegyületek) jelenléte is alacsony érzékszervi küszöbértékük miatt már kis mennyiségben nagyon károsan befolyásolják a borok aromáját (Rauhut, 1996).

A borkészítés során termelődő kén-hidrogén mennyisége és az abból származtatható illékony kénvegyületek elsősorban ez erjesztéshez alkalmazott élesztőgombák genetikai adottságával, hajlamával van összefüggésben (Romano és Suzzi, 1992).

Az élesztőgombák kénforrás asszimilációjával és a kéntartalmú szerves vegyületek anyagcseréjével kapcsolatban a legtöbb ismeret a *S. cerevisiae*-ről gyűlt össze, ahol a primer anyagcserét viszonylag jól ismerik, az ebben szerepet játszó géneket térképezték, és a szekunder anyagcsere termékeit főleg analitikai szempontból vizsgálták.

Ezzel ellentétben a *Schiz. pombe* kén anyagcseréjét hosszú időn keresztül egyáltalán nem vizsgálták. Az utóbbi időben rajtunk kívül két kutatócsoport kezdett foglalkozni ezzel a témakörrel, több irányból megközelítve: egyrészt a kéntartalmú aminosavak bioszintézisének enzimés útjai, és a transz-szulfuriláció vizsgálatával (Brzywczy és Paszewski, 1994; Brzywczy et al., 2002), illetve a kéntartalmú aminosavak bioszintézisének genetikai feltérképezésével (Naula et al., 2002).

A Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék élesztőbiotechnológiai csoportjában hosszú évek óta folynak kutatások a *Schizosaccharomyces pombe* törzsek almasavbontó képességét befolyásoló fiziológiai és genetikai tényezők vizsgálatával kapcsolatban. Új, javított törzseket hoztak létre hibridizációval, amelyek jó hatásfokkal bontották az almasavat borban és etanol hatására flokkuláltak (Geleta, 1996; Maráz és Geleta, 2001). Ilyen törzsekkel egy hatékony, esetleg folytonos almasavbontó technológia kifejlesztése válna lehetővé, amennyiben az élesztőgomba egyéb hátrányos tulajdonságait is sikerülne kiküszöbölni.

Doktori munkám során ezekbe a kutatásokba kapcsolódtam be.

Célom a *Schizosaccharomyces pombe* hasadó élesztőgomba kéntartalmú extracelluláris metabolit termelésének visszaszorítása volt, amelynek érdekében elkezdtük a *Schizosaccharomyces pombe* kén anyagcseréjének kutatását, kénanyagcserében sérült mutánsok indukálásával, izolálásával és analízisével.

2. Irodalmi összefoglalás

2.1. A *Schizosaccharomyces pombe*

A *Schizosaccharomyces pombe*-t 1893-ban izolálta Lindner egy afrikai sörből, a pombéból. Több mint 50 éve foglalkoznak citológiai és genetikai szempontból a *Schiz. pombe*-vel, a modern molekuláris biológiai és genetikai kutatás kedvelt modell-organizmusává vált.

A *Schizosaccharomyces* fajok vegetatív módon hasadással szaporodnak. A hasadó élesztők egysejtű aszkomicéták, amelyek többé-kevésbé hengeralakú sejtjei (Kreger-van Rij, 1984) közepén, hasadással osztódnak ketté. Ivaros szaporodásuk a sejtek konjugációjával, majd aszkospórák képzésével történik. Jól erjesztenek, viszonylag cukortűrők és vitaminigényesek, előfordulásuk erjedő növényi anyagokban, mustban gyakori.

A sejtbiológusok érdeklődését azzal keltette fel, hogy sejtosztódási folyamata nagyon eltér a sarjadzó élesztő sejtosztódásától és sokkal jobban hasonlít a legtöbb más eukarióta sejtosztódásához (Sunnerhagen, 2002). A genetikai kutatások szempontjából nagy előny a *S. cerevisiae*-vel szemben, hogy a laboratóriumi törzsek izogenikusak az eredeti Leupold féle izolátummal (Leupold, 1993).

2.1.1. A *Schizosaccharomyces pombe* rendszertani besorolása

A *Schiz. pombe*-t és a többi hasadó élesztőgomba fajt a *Schizosaccharomyces* genuszba sorolják, mely egy viszonylag kis csoportot képez az aszkomicéták között.

Molekuláris taxonómiai kutatások bebizonyították, hogy a *Schizosaccharomyces* fajok evolúciójuk során nagyon korán elágaztak a *Saccharomyces* ágról, így eredetüket tekintve távol állnak a jól ismert *Saccharomyces cerevisiae*-től, sőt úgy tűnik, sok tekintetben közelebb állnak a magasabbrendű eukariótákhoz, mint a *S. cerevisiae* (Sipiczki, 1995, 2000; Sunnerhagen, 2002).

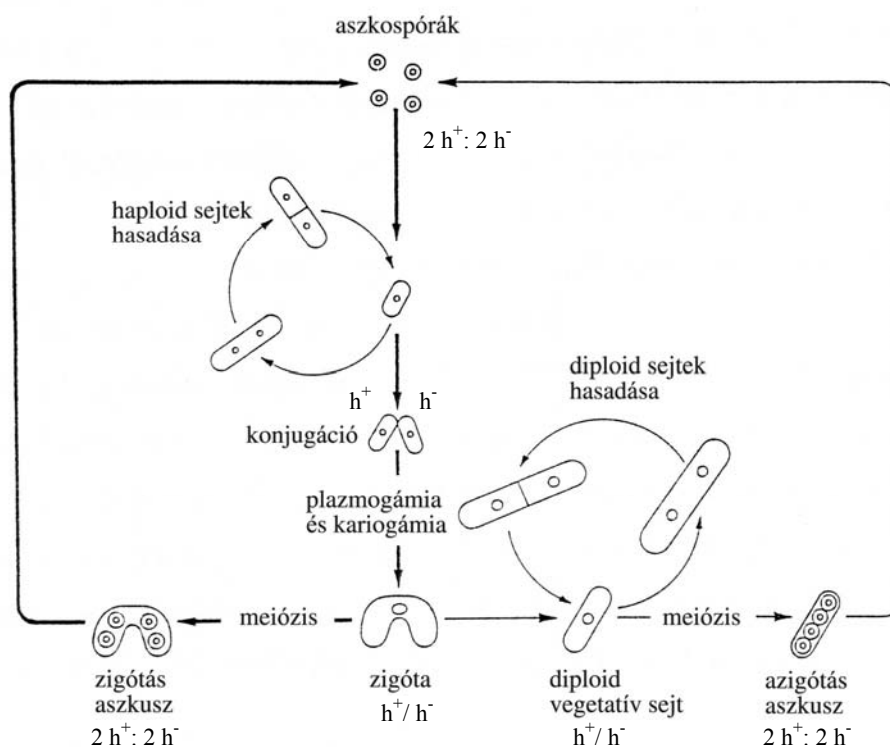
Az eddig leírt hasadó élesztők a jelenleg elfogadott rendszer szerint 3 fajhoz tartoznak:

1/ *Schizosaccharomyces japonicus*, 2/ *Schizosaccharomyces octosporus* és 3/ *Schizosaccharomyces pombe* (Vaughan-Martini és Martini, 1998), amelyeket hagyományos módszerekkel a spóráképzés, a hífaképzés és a különböző szénhidrátok erjesztési- és asszimilációs profilja alapján lehet megkülönböztetni. A *Schiz. japonicus* fajon

belül két változat létezik: *var. versatilis* és *var. japonicus*, amelyek jogosságát erősen vitatják a DNS homológia vizsgálatok (Vaughan-Martini, 1991), a két különböző változathoz tartozó törzsek közötti nagy gyakoriságú ivaros folyamat (konspecifikációs vizsgálatok) (Johannsen, 1981, Sipiczki et al, 1982), valamint enzimvizsgálatok (Yamada és Banno, 1987) alapján. A korábban külön fajként nyilvántartott *Schizosaccharomyces malidevorans* elkülönítését a *Schiz. pombe* fajtól nem támasztották alá DNS reasszociációs vizsgálatok, mivel a típustörzsek genomjai között 98%-os hasonlóság mutatkozott (Vaughan-Martini, 1991). Sipiczki és mtsi (1982) konspecifikációs kísérleteiben a két faj törzsei keresztezhetők voltak, a mitokondriális genom rekombinációja lejátszódott, a légzési lánc megegyezett és azonos elektroforetikus enzim mobilitás jellemezte a csoport összes törzsét (Yamada és Banno, 1987).

2.1.2. A *Schizosaccharomyces pombe* életciklusa

A *Schizosaccharomyces pombe* haplo-diplobionta faj, diploid állapota azonban nem stabil, meiózissal vagy vegetatív szegregációval haploid sejtek jönnek létre. Életciklusát az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra A *Schizosaccharomyces pombe* életciklusa (Munz et al., 1989)

Vegetatív módon a haploid vagy diploid sejtek hasadással szaporodnak. A haploid sejtek kétféle, h^+ vagy h^- párosodási (mating) típussal rendelkeznek, amelyek heterotallikus törzseknél stabilak, míg a homotallikus törzseknél (h^{90}) a kétféle mating típus átalakulhat egymásba. Az ivaros szaporodás során két ellentétes (h^+ és h^-) párosodási típusú sejt konjugál egymással és így diploid zigóta jön létre, amelyben a plazmogámia és a kariogámia egyidejűleg játszódik le. A diploid zigóta az esetek nagy részében rögtön askuszá alakul, amelyben meiózissal 4 askospóra jön létre. Az askusz ilyenkor a zigóta alakját mutatja, ezért zigótás askusznak nevezik. A haploid askospórák kicsírázásával vegetatív sejtek keletkeznek, amelyek mitotikus úton osztódva tenyészeteket hoznak létre. Spórázó tenyészetekben megfigyelhetők kis gyakoriságban a vegetatív sejt alakját mutató ún. azigótás askuszok is, amelyek a diploid zigótából kifejlődő diploid vegetatív sejtek meióziséval jönnek létre (Egel, 1989).

Homotallikus törzseknél az ivaros folyamat nitrogén-szegény környezetben könnyen lejátsszódik, hiszen a tenyészetben belül h^+ és h^- sejtek is találhatók, amelyek sejtfala a konjugáció során lizál és a sejtek fuzionálnak. A heterotallikus törzsek sejtjei a törzsön belül nem párosodnak egymással, és így askospórát sem képeznek. Ebben az esetben a keresztezés csak szomatikus hibridizációval valósítható meg, így például protoplasztfúzióval. A heterotallikus h^+ és h^- tenyészeteket összekeverve a nitrogénforrás elfogyásakor lejátsszódik a konjugáció, majd a spórázás.

2.1.3. A *Schizosaccharomyces pombe* genomja

A *Schiz. pombe* genomjának teljes mérete 13,8 Mb, ami 3 kromoszómán oszlik meg, melyek mérete rendre 5,7 Mb, 4,6 Mb és 3,5 Mb (Smith et al., 1987). Emellett ~20 kb méretű, sokkópiás mitokondriális genommal rendelkezik még (Lang et al., 1987; Wolf és Del Guidice, 1988).

A *Schiz. pombe* genomját számos kutatócsoport bevonásával, egy nagy nemzetközi projekt keretében szekvenálták (Wood et al., 2002). Korábbi becslések alapján 7 000-10 000 gént feltételeztek a *Schiz. pombe* esetében, de a szekvenálás során megállapították, hogy az eddig eddig leírt eukarióta genomok között a *Schiz. pombe*-nél van a legkevesebb proteint kódoló gén, szám szerint: 4 824.

A kromoszómákon a centromerek 35-100 kb mérettartományban vannak, a három centromer összesen körülbelül 0,2 Mb. A riboszómális RNS gének egy 10,4 kb méretű fragmentumon

találhatók, amely 100-120 ismétlésben van jelen, így összességében körülbelül 1,1 Mb helyet foglalnak el. A centromereken és a riboszómális RNS géneken túl tehát körülbelül 12,5 Mb méretű genomon oszlanak meg az egyedi génszekvenciák. Ez a méret megegyezik a *S. cerevisiae* genomjének ezzel a részével.

Míg a géneket kódoló szakaszok összességében rövidebbek, mint a *S. cerevisiae*-nél, a gének között elhelyezkedő régiók hosszabbak, amelyek feltehetőleg kiterjedtebb szabályozó szakaszok.

A gének 43 %-a tartalmaz intronokat. 50 gén szignifikáns hasonlóságot mutat emberi "betegség génekkel", amelyek fele a rákkal hozható összefüggésbe.

2.2. Molekuláris módszerek alkalmazása gombák rendszerezésében, identifikálásában és tipizálásában

A hagyományos élesztő identifikálási eljárások, amelyek morfológiai, élettani és biokémiai teszteken alapulnak, általában igen időigényesek és esetenként nem szolgáltatnak megbízható, egyértelmű eredményt (Rosini et al., 1982; Kurtzmann, 1994; Baleiras Couto et al., 1995). Ellentétben a hagyományos módszerekkel az újabb molekuláris genetikai eljárások megbízhatósága elsősorban azon alapszik, hogy a gén-szintű jellemzés független a mindenkori gén expressziótól (Baleiras Couto et al., 1994). A DNS szekvencia állandó, nem befolyásolja a sejt metabolikus folyamatai és a környezeti hatások. Ezért a modern taxonómia többféle molekuláris módszert is alkalmaz faji meghatározásra, fajkon belüli jellemzésre (tipizálásra), illetve nagyobb taxonok közötti különbségek vagy származási kapcsolatok feltérképezésére. Az élesztőgombák tekintetében is igen elterjedtek ezek a megbízható, többségében gyors identifikálásra és karakterizálásra alkalmas módszerek.

Az említett molekuláris módszerek a nukleinsavak szerkezetét négy szinten, úgymint

- (1) bázisösszetétel: a bázispárok moláris aránya (G+C mol%),
 - (2) a bázissorrend általános hasonlósága (DNS homológia vizsgálat a nukleotid szekvencia tényleges ismerete nélkül, amely lényegében két teljes genom összehasonlítására alkalmas),
 - (3) a DNS "ujjlenyomatok",
 - (4) a tényleges bázissorrend (nukleinsav szekvencia)
- síntjén vizsgálják (Deák, 1998).

Az "ujjlenyomat"-készítés mindazon elemző módszerek gyűjtőneve, amelyekkel egy törzs vagy faj DNS-éről egyedi mintázatú képet lehet nyerni. Ez többféle módon lehetséges:

- egész kromoszómák elektroforézises képének közvetlen értékelésével (kariotipizálás, vagy "kromoszóma ujjlenyomat" készítés),
- endonukleázokkal szabdalts DNS töredékek elektroforetikus képének értékelésével (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphisms),
- specifikus, jelölt DNS-próbák hibridizációjával,
- "PCR-ujjlenyomatok" készítésével, amikor különböző primerekkel amplifikált DNS szakaszok elektroforetikus gélmintázatát használják fajok illetve törzsek közötti különbségek kimutatására (pl. RAPD-PCR analízis – lásd később).

Az említett molekuláris módszereket az elérni kívánt cél alapján érdemes megválasztani annak figyelembevételével, hogy azok eltérő mélységű különbségeket képesek kimutatni a vizsgált genomok között. A DNS bázisösszetétel és a homológia vizsgálatok, illetve a különböző módszerekkel kapott "ujjlenyomat" mintázatok többnyire faji szintű meghatározást vagy a törzsek fajon belüli elválasztását (tipizálását) teszik lehetővé, míg a szekvencia vizsgálatok (pl. ribonukleinsav szekvencia) a fajnál nagyobb rendszertani kategóriák közt is különbséget tesznek és alkalmasak filogenetikai rokonsági kapcsolatok feltárására (Kurtzmann, 1994; Kurtzmann és Phaff, 1987; Vaughan-Martini és Kurtzmann, 1985; Vaughan-Martini és Martini, 1987).

2.2.1. RAPD-PCR analízis

A RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) analízis során random oligonukleotid primerekkel különböző nagyságú és erősségű fragmenteket amplifikálnak a nukleáris DNS-ről. A keletkezett fragmentumokat agaróz gélben elektroforézissel szétválasztva és festve, az adott törzsre jellemző mintázatot kapunk.

Az eljárás könnyen kivitelezhető, nem szükséges előzetes információ a génekről, sőt a primer szekvencia előzetes ismerete sem és segítségével genom szekvencia szinten lehet különbséget kimutatni (Williams et al., 1990). A RAPD-PCR technika kiválóan bizonyult rokon fajok jellemzésére (Baleiras Couto et al., 1995), az eljárás segítségével olyan törzsek esetében is tudtak különbségeket kimutatni, ahol ez más módszerrel már nem sikerült (Novo et al., 1996; Masclaux et al., 1996), de az eljárás reprodukálhatósága és a távoli rokonságban lévő fajok esetében a módszer alkalmassága vitatott.

2.2.2. A riboszómális DNS RFLP analízise ("ribotipizálás")

Az rDNS (riboszómális RNS-t kódoló nukleáris DNS) szekvencia különösen alkalmasnak bizonyult filogenetikai elemzésre, mivel az rRNS-ek a sejtekben egyetemesen megtalálhatók, az azonos funkciójú molekulák homológok és összehasonlíthatók, az rRNS molekulák konzervatívok, mivel a riboszóma alapvető funkciója kevés változást enged meg. Mégis az rRNS különböző részei az evolúció során eltérő mértékben változtak, ezért a rendszertani kapcsolatok vizsgálatát nagyon tág határok közt lehetővé teszi (Kurtzman, 1992). Az *S. cerevisiae*-ben és hozzá hasonlóan sok más élesztőben az rRNS gének sokszor ismétlődő szakaszokban együtt helyezkednek el. A 18S, 5.8S és a 25S rRNS gének között belső, a végükön külső elválasztó szekvenciák vannak. Az rRNS gének összetétele általában erősen konzervált és összehasonlító vizsgálatukból különböző taxonómiai szintű filogenetikai következtetések vonhatók le. Az elválasztószakaszok evolúciós változása gyorsabb és ezek közeli fajok vagy akár törzsek elkülönítését is lehetővé teszik.

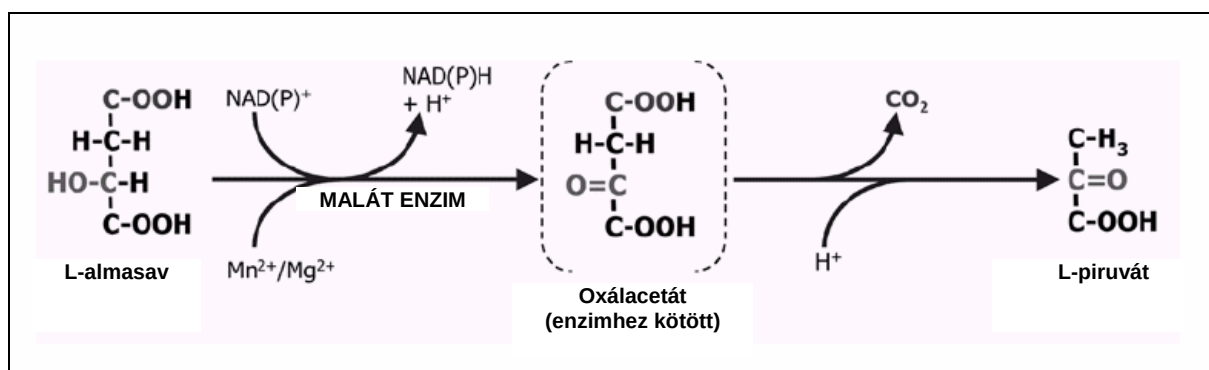
Az rDNS RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) analízise során az rRNS gének különböző szakaszaival komplementer primer párok segítségével amplifikált PCR terméket (azaz az rDNS bizonyos szakaszát) restrikciós endonukleázokkal hasítják. Az emésztéssel nyert változó hosszúságú fragmentumokat azután agaróz gélben elektroforézissel elválasztják, majd festéssel vizualizálják, és a kapott "ujjlenyomatokat" hasonlítják egymáshoz. Ezt az eljárást más néven "ribotipizálásnak" nevezzük, amelyet nagyon eredményesen alkalmaztak az élesztőknél faji szintű meghatározásra (Smole Mozina et al., 1997; Dlačny et al., 1999).

2.3. A *Schizosaccharomyces pombe* malo-etanolos fermentációja

A *Schiz. pombe* egyes törzsei anaerob körülmények között az almasavat jó hatásfokkal erjesztik etanollá és CO₂-dá, ez az ún. malo-etanolos fermentáció (MEF).

Izotópos kísérletekkel bebizonyították, hogy *Schiz. pombe* esetében az almasav oxidatív dekarboxilezése piroszölősavvá, majd ennek etanolos erjesztése vezet az almasav lebontásához (Maconi et al., 1984).

Az L-almasav oxidációját oxálacetáttá a NAD(P)-függő malát enzim katalizálja, majd pedig az oxálacetát dekarboxilációjával piruvát keletkezik (2. ábra).

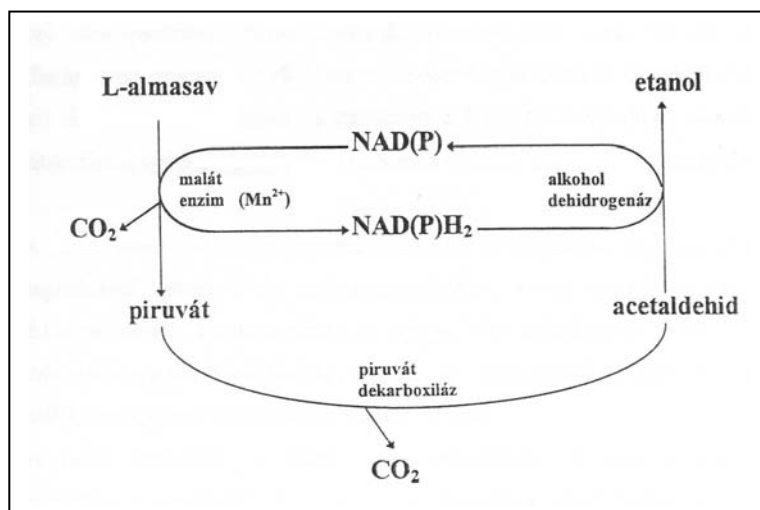


2. ábra A NAD(P)-függő malát enzim által katalizált reakció: az L-almasav oxidációja oxálacetáttá, melyből dekarboxilációval piruvát keletkezik (Volschenk et al., 2003)

A piroszölősav további dekarboxilezése, majd redukciója a jól ismert etanolos fermentációval történik.

A citoplazmás malát enzim jól elkülöníthető a citrátkör malát dehidrogenáz (MDH) enzimétől, és aktivitását több külső és belső környezeti tényező is befolyásolja (pl. pH, ionok, O₂ mennyisége). A malát-enzim Mn²⁺ függő, ami jellemző az összes malát enzimre (Fuck és Radler, 1972). Ugyanakkor az is látható, hogy az almasav sem szén-, sem energiaforrásként nem hasznosul, mivel a malát-enzim által létrehozott NADH₂-t az acetaldehidnek etanollá történő redukálása során az alkohol-dehidrogenáz felhasználja, az almasavnak pedig egyetlen

C-atomja sem épül be az élesztő szerves vegyületeibe. A 3. ábra részleteiben szemlélteti a citoplazmás malát enzim segítségével történő almasav erjlesztést.



3. ábra Az élesztő L-almasav erjlesztése anaerob viszonyok között (Fuck és Radler, 1972)

Ennek következtében anaerob körülmények között a *Schiz. pombe* csak glükóz vagy egyéb energiaforrás jelenlétében képes az L-almasavat metabolizálni (Osotshilp és Subden, 1986b).

A malát enzim a *Schiz. pombe*-hoz hasonlóan a *S. cerevisiae*-ben is megtalálható, de a *Schizosaccharomyces* törzsek almasavbontó képessége mégis sokkal jobb, mint a *Saccharomyces* törzseké. A két élesztőgomba faj malát-enzimeinek szubsztrát affinitása (K_m -értéke) azonban nem mutat olyan mértékű eltérést, ami megmagyarázhaná a nagymértékű különbséget az almasavbontási képességükben (Fuck et al, 1973; Temperli et al., 1965).

Az eltérés a malát transzport mechanizmusának különbségével magyarázható. A *S. cerevisiae* egyszerű diffúzióval veszi fel az almasavat és egyéb dikarbonsavakat, ezért csak lassú és kismértékű (16-33%-os) almasavbontásra képes (Salmon, 1987). A transzport a koncentrációgradiens ellenében nem játszódik le, így az intracelluláris térben az almasav nem tud felhalmozódni.

A *Schiz. pombe* ezzel szemben aktív transzporttal veszi fel az almasavat egy carrier molekula segítségével, amely a *Saccharomyces*ekhez hasonlóan nem szubsztrátspecifikus, és az almasavon kívül egyéb dikarboxilsavak transzportjára is képes. A trikarbonsav-ciklus különböző intermedierjei közül például az oxálacetát és a szukcinát kompetitíven gátolja a malát transzportot, a transzport optimális pH-ja 3.5, hőmérsékleti optimuma 30 °C (Osotshilp és Subden, 1986b).

Mivel a malát-transzport a *Schizosaccharomyces*ekben a koncentrációgradiens ellenében is lejátszódik, ezért a körülmények optimalizálásával borban akár 100 %-os almasavbontást is el lehet érni.

A malát-transzport energiafüggő, ami azzal jár, hogy a *Schizosaccharomyces* almasavbontásához más szénforrásnak (pl. glükóz) is jelen kell lenni a környezetben. A glükóz ATP révén energiát szolgáltat a malát-transzportnak, mivel az endogén ATP nem volna elég a mérhető aktív transzporthoz (Sousa et al., 1992a). Az almasav a *mae1* gén által kódolt permeáz enzim segítségével lép be a sejtbe. A gént klónozták és az I. kromoszómára térképezték (Grobler et al., 1995).

A malát, mint már említettük, sem szénforrást, sem energiaforrást nem jelent a sejt számára, a hasadó élesztő abból biomasszát nem képez. Korábbi felfogások szerint az almasav metabolizmusa szorosan összefügg a sejtek növekedésével (Dittrich, 1963) és a cukorfogyasztással (Osotshilp és Subden, 1986a), de Taillander és mtsi (1988) kísérleteikkel nem igazolták ezt a feltevést. Stacioner szaporodási fázisban lévő sejteknek a cukor felhasználásával csökkent az életképessége és ezzel az almasavbontó aktivitása is. Auriol és mtsi (1987) kimutatták, hogy nagy almasavtartalom esetében a malát teljes mennyisége a szaporodás logaritmikus fázisa alatt teljes mértékben nem tudott degradálódni, ilyenkor az folytatódott a stacioner fázisban lévő tenyészetnél is a teljes lebontásig. Ha már stacioner szaporodási fázisban lévő sejtekhez adagoltak almasavat, az is teljes mértékben degradálódott. Magyar és Panyik (1989) rögzített sejtes kísérleteiben a már nem szaporodó élesztősejtek is jó almasavbontó aktivitást mutattak.

2.3.1. Borok savtartalmának csökkentése malo-etanolos fermentációval

A must és ezáltal a borok is többféle szerves savat tartalmaznak, melyek közül mennyiségük miatt a legjelentősebbek az almasav, a borkósav, a tejsav, a szukcinát, a glükonát, illetve az aminosavak (Radler, 1993). Ezek egyrészt a szőlőből erednek, másrészt az erjedés során az élesztők illetve egyéb mikroorganizmusok anyagcseretermékeként kerülhetnek a borba.

Hideg éghajlaton gyakran nagymennyiségű almasav halmozódik fel a szőlőben, ami az abból készült bornak is erős savhatást kölcsönöz, rontva annak minőségét. Ilyen esetben szükségessé válik az almasav részleges vagy teljes lebontása. A borászati gyakorlatban erre a következő alapvető módszereket dolgozták ki:

- CaCO_3 -os savmegkötés (Steele és Kunkee, 1978), amely során a borkósav mennyiségét csökkentik
- tejsavbaktériumokkal történő biológiai almasavbontás, a *malo-laktikus fermentáció* (MLF), melynek során az almasavat tejsavvá alakítják, amely sokkal gyengébb savhatást biztosít (Guilloux-Benatier et al., 1985).

A CaCO_3 -tal történő savmegkötés során ügyelni kell arra, hogy a borban legalább 0,5-1 g/l szabad borkósavtartalom visszamaradjon, mert az a bor savas karakterének kialakításában illetve a bor fejlődésében, érésében is fontos szerepet játszik. A CaCO_3 -os savtompítás megváltoztatja a savak összetételét: a borkósav csökkenése révén túlsúlyba kerül az almasav, ami általában nem kívánatos.

A malo-laktikus fermentáció módszerét főként száraz vörösborok almasavtartalmának csökkentésére fejlesztették ki és alkalmazzák világszerte (Lafon-Lafourcade et al., 1983). Az eljárásnak azonban számos nehézsége van, ezeket a bevezetőben már említettem.

Mivel a *Schiz. pombe*-val történő malo-etanolos fermentáció alapján kifejleszthető almasavbontási technológia olyan alternatív lehetőséget nyújthana a borászoknak, amellyel kiküszöbölhetőek lennének a malo-laktikus fermentáció hátrányai, különböző kutatócsoportok az MEF többféle gyakorlati kivitelezését tanulmányozták. Az alkoholos erjedést követő almasavbontás nehézsége, hogy a kierjedt borban már nincs jelen a *Schiz. pombe* szaporodásához elengedhetetlen szén-forrás, csak cukor adagolással lehetne a szaporodás feltételeit megteremteni. A legjobb eredményeket eddig úgy érték el, hogy a must részleges almasavbontását *Schizosaccharomyces*ekkel elvégezve, eltávolították azokat, majd ezt követte a borélesztők alkoholos erjesztése (Delfini et al., 1982; Snow és Gallander, 1979).

A *Schizosaccharomycesek* eltávolítása a MEF-t követően azonban borászati (ipari) körülmények között technikailag nehezen megoldható feladat. Ezt próbálták megoldani immobilizált sejtekkel (biokatalizátor) használatával (Magyar és Panyik, 1989; Yokotsuka et al., 1993; Rosini és Ciani, 1993; Ciani, 1995) illetve felmerült a probléma megoldásaként az élesztő flokkuláció lehetőségének kihasználása (Geleta, 1996).

Az erjesztés előtti almasavbontás során azonban több nehézséggel is kellett számolni: a *Schiz. pombe* esetenként elbontotta az almasav teljes mennyiségét, vagy éppen a *Saccharomycesek* túlnőtték a *Schizosaccharomyceseket* ezzel gátolva azok optimális működését (Benda és Schmitt, 1969; Gallander, 1977). Minden esetben komoly problémát jelentett továbbá az erjesztés előtti vagy a részben kierjesztett borokban végzett almasavbontás során, hogy a *Schiz. pombe* törzsek kellemetlen kén tartalmú aromavegyületeket termeltek. Erre vonatkozóan egyetemünk Borászati Tanszékén is végeztek már vizsgálatokat és a különböző *Schiz. pombe* törzsek között kénhidrogén termelésben alapvető eltéréseket tapasztaltak (Varga, 1992). A nitrogén forrás minősége sem elhanyagolható ebből a szempontból, megfigyelések szerint a szerves nitrogénforrásokon erősebb a H_2S termelés, mint a szervetlen ammóniumsón, továbbá nitrogénforrás hiányában erősen megnövekszik a kénhidrogén termelés (Varga, 1992; Németh, 1995). A tápközeg magasabb etanol tartalma (kb. 10%) lényegesen csökkentette a törzsek kénhidrogén termelését, de ugyanakkor az almasavbontás hatékonyságát is (Németh, 1995).

2.4. Az élesztőgombák kénforrás metabolizmusa és a kéntartalmú vegyületek bioszintézise

2.4.1. Kénvegyületek az élesztőgombákban és a szaporodás kénforrás igénye

Kéntartalmú vegyületek számos szervesetlen illetve szerves formában vannak jelen a környezetben. A kén jelenléte minden élőlény számára, így az élesztők részére is alapvető fontosságú, hiszen számos szerves vegyület felépítésében vesz részt: vitaminok, koenzimek és aminosavak (metionin és cisztein) alkotóeleme. A tiol-csoport az elektron-transzport láncban és a növekedés, illetve a sejtszétválás folyamatában több enzim aktív centrumának fontos alkotója.

A kén oxidációs állapota különböző vegyületeiben -2-től +6-ig terjed. A köztes oxidációs állapotú kéntartalmú vegyületek kémiai és biológiai aktívak.

Az élesztők képesek a szulfátot, mint a legmagasabb oxidációs számú kéntartalmú vegyületet szulfittá, majd szulfiddá redukálni, amely általában beépül a szerves kénvegyületeikbe. Ezt nevezzük a szulfát asszimilációs redukciónak, amelyről a továbbiakban majd részletesen tárgyalunk.

Az összes kén mennyisége az élesztőben az anyagcserében játszott fontos szerepéhez képest kicsi, a *Saccharomyces cerevisiae*-ben a száraz tömeg 0,2-0,9 %-a (Maw, 1963a; 1965). Az élesztősejtben a legjelentősebb kénvegyületek a metionin és cisztein aminosavak, a cisztein, valamint a glutathion tripeptid. A glutathion koenzimként játszik fontos szerepet, tiol-csoportokat szolgáltat és fontos szerepe van a biológiai redox-rendszerben. A cisztein és metionin a peptidok illetve proteinek szintéziséhez elengedhetetlen. A cisztein SH-csoportja több enzim katalitikus centrumában szerepel, továbbá a glutathion tripeptid és a cisztein összetevője. A ciszteamin (ami a cisztein dekarboxilációs terméke) szulfhidril csoportja a coenzim-A funkcionális csoportja.

A szervesetlen kén sejtben belül - főleg szulfát alakjában - kis mennyiségben van jelen. Kimutatták, hogy a szabad, szervesetlen szulfát csak rövid ideig marad a sejtben ebben a formában, nagy része átalakul szerves kéntartalmú anyagokká. Maw (1963) sörélesztővel végzett kísérletei szerint 1 óra után az élesztő által a tápközegből felvett szulfát-kén 60 %-a protein-kénként alakult át, mindössze 5 %-át tudta mérni raktározott szulfát-ionok formájában.

Maw (1965) sörélesztővel végzett kísérletei szerint az *S. cerevisiae* szaporodásához 10 mg/l összes kén szükséges. Asszimilálható kénforrás hiányában az élesztő szaporodása gátlődik. Az élesztők S-tartalmú vitamin igénye (biotin, tiamin) meglehetősen különböző. A *S. cerevisiae*-nek szüksége van biotinra, viszont képes növekedni tiamin nélkül is, bár az optimális növekedéshez 50-500 µg/l tiamin mégis szükséges (Maw, 1965). A maximális növekedéshez 100 µg/l biotin kell, sok élesztő számára azonban 1 µg/l biotin is elegendő. A biotin elégtelenség a glükóz és a fruktóz fermentációját gátolja és csökkenti a C₁₈-zsírsavak szintézisét, csökken a DNS-, RNS- és összprotein-tartalom, valamint jelentősen megváltozik a poliszacharid-összetétel. A sejtfal glükántartalma növekszik, a mannántartalma csökken, ezáltal a sejt törékenyebbé válik (Maw, 1965).

2.4.2. A kénvegyületek felvétele

2.4.2.1. A szervesetlen kénvegyületek transzportja

A szervesetlen szulfát az élesztők számára a legfontosabb kénforrás. Mint minden szervesetlen ion, a szulfát is egy nagyon specifikus membrán transzport rendszer segítségével jut a sejtbe.

Saccharomyces cerevisiae-ben Maw (1963b), illetve Roomans és mtsi (1979) egyetlen szulfát-transzport rendszert írnak le, amely Michaelis-Menten kinetikát követ. Breton és Surdin-Kerjan (1977) szerint azonban a *S. cerevisiae* szulfát-felvételében két permeáz vesz részt, amelyek kétfázisú Lineweaver-Burk kinetikát mutatnak, az I. permeáz nagyobb aktivitású ($K_m=0,005\text{mM}$) mint a II. permeáz ($K_m=0,35\text{mM}$). E két permeáz aktivitását gátolja az endogén szulfát és az APS (adenozin-5-foszfoszulfát), mely utóbbi a szulfát asszimiláció egyik intermediere.

Elsőként Smith és mtsi (1995) izoláltak a *S. cerevisiae*-nél szulfát-felvételben sérült mutánsokat, majd klónozták a *SUL1* gént, melynek inaktiválása okozta a szulfát transzport sérülését. Szelenát- és kromát-rezisztens mutánsok szisztematikus vizsgálatával a *SUL1* mellett további két, a transzportért felelős gént írtak le, a *SUL2* és *SUL3* géneket. Szulfát transzport kinetikai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a *SUL1* és *SUL2* gének nagy affinitású szulfát-transzporter proteineket kódolnak. A *SUL3* gén "terméke" pedig a *SUL2* transzkripció szabályozásában vesz részt, de a reguláció pontos mechanizmusa még nem tisztázott (Cherest et al., 1997).

A sejtek optimális szulfát felvételéhez megfelelő energia- és nitrogénforrásnak kell rendelkezésre állni (Maw, 1963b). Az L-metionin, L-cisztein, és DL-homocisztein visszaszorítják a szulfátfelvételt. Ez a hatás nem észlelhető glutation és cisztin esetében.

A *Saccharomyces* fajok többségénél a szerves szulfát helyettesíthető szulfittal vagy tioszulfáttal. A szulfid vizes közegben három formában lehet jelen, amelyek részaránya a közeg pH-jától függ. Erősen savas pH tartományban (<1,77) az SO_2 forma a domináns, míg lúgos pH értékek mellett (>7,2) a szulfid többnyire SO_3^{2-} formában fordul elő. Köztes pH-értékeknel a két említett forma, illetve a biszulfid ion (HSO_3^-) együttesen van jelen.

Az első szulfid transzport vizsgálatok azt mutatták, hogy a szulfid csak SO_2 formában képes aktív transzporttal a sejtbe jutni (Macris és Markakis, 1974). Egy későbbi tanulmányban Stratford és Rose (1986) szintén arról számolt be, hogy szaporodást a pH=3-5 tartományban tapasztaltak, ám itt a szerzők azt feltételezik, hogy a SO_2 -ot egyszerű diffúzióval veszik fel a sejtek.

2.4.2.2. A szerves kénvegyületek transzportja

A *Saccharomyces* fajok esetében már korán kimutatták, hogy azok a szerves szulfáthoz hasonlóan a metionint is aktív transzporttal veszik fel a közegből (Maw, 1963, Suomalainen és Oura, 1971). A *S. cerevisiae*-ben a másik kéntartalmú aminosav, a cisztein transzportját is jellemezték. A glutationt, mint szerves kénforrást, a metioninhoz hasonlóan hasznosítja a *S. cerevisiae*.

Az élesztőben valamennyi aminosavat specifikus vagy nem specifikus permeázok transzportálnak. Az általános aminosav permeáz (Gap1p) a fehérjékben található összes L-aminosavat, továbbá hasonló vegyületeket – mint ornitin, citrullin, néhány D-aminosav és toxikus aminosav analógok – transzportálni képes (Wiame et al., 1985). A Gap1p ugyanakkor bizonyos körülmények között nem működik, például nitrogénforrásként ammónium jelenlétében aktivitása megszűnik. Ilyenkor az aminosavakat specifikus, a sejtmembránba integrálódott permeázok transzportálják

A metionin transzportjánál egy nagy affinitású (*MUP1*) és két kis aktivitású (*MUP2* és *MUP3*) specifikus permeáz kódoló gént írtak le (Isnard et al., 1996). A cisztein specifikus transzportja is ismert, de a transzportért felelős gént még nem izolálták. Egy kinetikai tanulmányban egyetlen cisztein permeáz jellemezték, melyet a homocisztein illetve metionin

gátolnak és a transzport rendszer feltehetőleg az intracelluláris cisztein tartalom által szabályozott (Ono és Naito, 1991).

2.4.3. A kénvegyületek asszimilációja és a kéntartalmú vegyületek bioszintézise

2.4.3.1. A szulfát redukciója

A leggyakoribb kénforrás, a szulfát egy asszimilációs-redukciós anyagcsereút során szulfiddá redukálódik és szulfidként (S^{2-}) épül be a szerves vegyületekbe (De Robinchon és Surdin-Kerjan, 1971, Jones és Fink, 1982). Az anyagcsere folyamat lépései a 4. ábrán láthatók. (A szövegben zárójelbe tett számok a 4. ábrán számozással feltüntetett enzimeket jelölik.)

A szulfát és szulfid közötti szabadenergia különbség (ΔG°) 800 kJ/mol, tehát jelentős energia befektetésre van szükség ehhez a redukcióhoz, ezért a redukciós lépést a szulfát aktiválása előzi meg.

Az extracelluláris szulfátot a szulfát permeázok (1.) juttatják a sejtbe. *S. cerevisiae* esetében két nagy aktivitású szulfát permeázt mutattak ki, ahogyan azt már az előzőekben tárgyaltuk.

A transzportot a sejten belül a szulfát aktiválása követi, amely két lépcsőben valósul meg. Először az adenosin-5-trifoszfátból (ATP) és a szulfátból pirofoszfát lehasadásával adenosin-5-foszfoszulfát (APS) képződik. Ezt a reakciót az ATP-szulfuriláz (más néven: szulfát-adenylyl-transzferáz) (2.) katalizálja. A reakció energetikailag a szulfát és ATP képződés irányának kedvez. A reakció csak azért mehet végbe, mert pirofoszfát hasad le a szervesetlen pirofoszfátáz hatására, valamint az anyagcsere folyamat következő enzimének K_m -értéke az APS-re nézve nagyon alacsony (Slaughter, 1989).

Második lépcsőben az APS foszforilezése történik 3'-foszfo-adenosin-5'-foszfoszulfáttá (PAPS), amit az APS-kináz (3.) katalizál.

Az ATP-szulfuriláz enzim egy hat monomerből álló homohexamer (Ullrich et al., 2000). A *S. cerevisiae* ATP-szulfuriláz enzimét a X. kromoszóma *MET3* génje kódolja (Cherest et al., 1987). A *met3* mutánsok nem képesek a szervesetlen szulfátot kénforrásként hasznosítani, de a többi szervesetlen kénvegyület, a tioszulfát, szulfid és szulfid jelenlétében, illetve szerves kénforrásokon képesek szaporodni. Az ATP-szulfuriláz enzimet kódoló gént élesztőgombából és magasabbrendű szervezetekből is sikerült klónozni (Klonus et al., 1994, 1995).

Az APS-kináz aktív állapotában egy homodimer molekula (Schriek és Schwenn, 1986), melynek monomerjét a *MET14* gén kódolja (Massetot és Surdin-Kerjan, 1977). A gént klónozták (Fitzgerald-Hayes, 1982) és szekvenálták (Korch et al., 1991). A Met14p aminosav szekvenciája nagyon hasonló más mikroorganizmusoknál leírt APS-kinázok szekvenciájához (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

A szulfát ion két lépcsőben lejátszódó aktiválása után következik az első redukciós lépés: a PAPS-reduktáz (4.) a PAPS-ot szulfittá és foszfo-adenil-foszfáttá (PAP vagy 3'-5'-difoszfo-adenozin) redukálja. Ebben a folyamatban a NADPH, mint elektron donor vesz részt (Peck és Lissolo, 1988). A reakciót egy komplex elektron-transzport rendszer irányítja. *In vitro* a PAPS redukciója három izolált protein frakciót igényel: az A, B, és C egységet. Közülük kettő, az A és a B hőérzékeny, nagy molekulásúlyú, míg a C frakció egy hőálló, nem dializálható, kis molekulásúlyú enzim (Wilson et al., 1961). Porqué (1970) bizonyította, hogy a PAPS *in vitro* redukciójához három protein szükséges: ezek a tioredoxin, a tioredoxin-reduktáz és a PAPS-tiol-szulfotranszferáz, amelyek sorban a C, A és B enzimfrakcióknak felelnek meg.

A szulfátcsoport C frakcióra való átvitele során a kénatom nem közvetlenül redukálódik +6-ról +4-re. Először +6-ról +5-re változik a vegyérték, ezután spontán intramolekuláris redoxireakció megy végbe, amikor diszulfid képződik és egy +4 oxidációs állapotú szulfít-anion szabadul fel. Ezért a PAPS-reduktázt PAPS-tiol-szulfotranszferáznak is nevezik (Peck és Lissolo, 1988).

S. cerevisiae-ben a PAPS-reduktázt a *MET16* gén kódolja és az aktív enzim egy homodimer molekula (Thomas et al., 1990, Berendt et al., 1995).

A szulfít, mint köztestermék transzportálódhat a közegbe akár a szulfít-permeázsal (5.) aktívan, vagy passzívan, diffúzióval (Stradford és Rose, 1986).

Az intracelluláris szulfít a szulfít-reduktáz (6.) hatására szulfiddá redukálódik. Ebben a redukciós lépésben három NADPH szerepel elektrondonorként (Yoshimoto és Sato, 1968).

A *S. cerevisiae* tisztított szulfít-reduktáza olyan komplex protein, amely különböző prosztetikus csoportokat tartalmaz: flavin mononukleotidot (FMN), flavin adenin dinukleotidot (FAD), vas-porfirin gyűrűt és egy sirohaem speciális prosztetikus csoportot (Kobayashi és Yoshimoto, 1982a,b,c).

A *S. cerevisiae* szulfít-reduktáz enzime négy alegységből áll: két α és két β alegységből. Az α -alegységet a *MET10* (Kobayashi és Yoshimoto, 1982a), a β -alegységet a *MET5* (Kobayashi és Yoshimoto, 1982b) gén kódolja. Ezen génekben sérült mutánsok fenotípusa megegyezik (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

2.4.3.2. A cisztein és metionin bioszintézise

A redukált kén úgy épül be a szerves szénvegyületekbe, hogy a szulfid ion a cisztein és metionin aminosavak szintézisének különféle elővegyületeivel reagál, ez az első lépés a kéntartalmú aminosavak szintézisében.

A cisztein képződésének *Saccharomyces cerevisiae*-ben két útja van (Jones és Fink, 1982, Ono et al., 1988).

1. Az egyik reakcióút első lépése a szerin acetilezése szerin-acetiltranszferázzal (7.) O-acetilszerinné. Ezt a reakciót szulfhidrilezés követi (8a + b), amikor cisztein keletkezik, szabad vagy kötött szulfid felhasználásával. Két enzim katalizálja a folyamatot: a cisztein-szintáz felelős a cisztein termelésért, míg a bifunkciós homocisztein-szintáz (amelyet bifunkciós szulfhidriláznak, vagy O-acetilhomoszerin-O-acetilszerin-szulfhidriláznak is neveznek) a cisztein és homocisztein keletkezését is segíti (Yamagata, 1989).
2. A második reakcióút a homocisztein és a szerin kondenzációjával kezdődik, amelyben cisztationin képződik a cisztationin- β -szintáz (9.) hatására. Ezt egy hasítás követi, amelyet a cisztationin- γ -liáz (10.) katalizál, és a reakcióban cisztein keletkezik.

S. cerevisiae-ben a cisztationin- β -szintáz enzimet az *STR4* (Cherest és Surdin-Kerjan, 1992, Ono et al., 1992), a cisztationin- γ -liáz enzimet az *STR1* (Cherest és Surdin-Kerjan, 1992, Cherest et al., 1993) gén kódolja.

A metionin keletkezése a homoszerinnek a homoszerin acetiltranszferázzal (11.) katalizált, acetyl-CoA-függő acetilezésével kezdődik (Naiki és Yamagata, 1973). A *S. cerevisiae* homoszerin acetiltranszferáz enzimét a *MET2* gén kódolja (Cherest et al., 1979). Az O-acetilhomoszerin homociszteinné alakulásának két lehetséges útja van:

1. az O-acetilhomoszerin közvetlen szulfhidrilezése homociszteinné. A szulfhidril csoport szabad szulfidként vagy tioredoxin carrierrel vihető át. A reakciót az O-acetilhomoszerin szulfhidriláz (homocisztein-szintáz) (12.) katalizálja.

2. az O-acetilhomoszerin kondenzációja ciszteinnel cisztationin- γ -szintáz közreműködésével (13.) cisztationinná. Ezután a cisztationin- β -liáz (14.) a cisztationint homociszteinre, piruvátra és ammóniumra bontja.

Még nem tisztázott a kérdés, hogy a két reakcióút közül melyik dominál (Yamagata, 1989).

A metionin ezután a homociszteinből keletkezik a kénatom metilezésével, amely reakciót a homocisztein-metiltranszferáz (15.) katalizálja.

Az élesztőgomba metionin szintézisében szereplő két kulcsfontosságú enzimét kódoló géneket is sikerült már meghatározni: az O-acetilhomoszerin szulfhidriláz (homocisztein-szintáz) enzimet (12.) a *MET25* gén kódolja (Thomas et al., 1992b), a homocisztein-metiltranszferázt (15.) pedig a *MET6* gén (Csaikl és Csaikl, 1986, Mountain et al., 1991). A *S. cerevisiae* *met25* mutánsát *Schiz. pombe* cDNS könyvtárral transzformálva, majd plazmidról visszaizolálva már megtalálták a homocisztein-szintáz enzimet kódoló gént *Schiz. pombe*-ban is (Brzywczy et al., 2002).

A metionin a cisztein prekursora is lehet (Ono et al., 1988). A bioszintézisnek ez az útja az S-adenozil-metionin (SAM) képződésével kezdődik a SAM-szintáz (16.) hatására. A következő lépés a SAM demetilezésére S-adenozil-homociszteinné SAM-demetilázsal (17.). Az S-adenozil-homocisztein adenozil-homociszteináz (18.) közreműködésével homociszteinné alakul, majd ezt a β -cisztationin-szintáz (9.) cisztationná alakítja. A ciszteinné alakulás utolsó lépését a γ -cisztationáz (10.) katalizálja.

A *S. cerevisiae*-ben Chiang és Cantoni (1977) két független S-adenozil-metionin szintáz (16.) enzimet írtak le. Ezt az eredményt később megerősítette, hogy mindkét enzimet kódoló gént, - *SAM1* és *SAM2* - megtalálták (Cherest et al., 1978). Nem befolyásolta a sejtek szaporodását, ha a két gén közül bármelyiket inaktiválták, ezzel bebizonyították, hogy azok aktivitása valóban független egymástól (Thomas et al., 1988).

Érdekes megjegyezni, hogy a *Schiz. pombe*-ban a kén-metabolizmusban szerepet játszó gének közül elsőként az S-adenozil-metionin szintáz enzimet kódoló *SAM1* gént vizsgálták és klónozták (Hilti et al., 2000).

2.4.3.3. Transz-szulfurilációs anyagszereút hiánya a *Schizosaccharomyces pombe*-ban

Az un. transz-szulfurilációs anyagszereút azokat a reakciókat tartalmazza, amelyek lehetővé teszik a cisztein és homocisztein átalakulását egymásba a cisztationin intemedieren keresztül. *Saccharomyces cerevisiae*-ben mindkét transz-szulfurilációs út létezik, azaz mindkét irányban

lejátszódik a folyamat, míg az emlős sejtekben csak a homocisztein $\rightarrow$ cisztein irány működik, enterobaktériumokban pedig a cisztein $\rightarrow$ homocisztein út.

A *Schiz. pombe*-ban a cisztationin β -szintáz (9.) és a cisztationin γ -liáz (10.) enzimek aktivitásának hiányában a metioninból homociszteinen keresztül nem képződik cisztein (Brzywczy et al., 2002), ezért elvileg a metionin nem is lehet kén-forrás a hasadó élesztő számára, hiszen a cisztein keletkezéséhez nem közvetlen prekursor. Ugyanakkor a *Schiz. pombe* képes a metionint egyedüli kénforrásként hasznosítani és izoláltak illetve térképeztek is metionin auxotróf mutánsokat. Kohli és mtsi (1977) az általuk izolált metionin auxotróf mutánsokat izolálási sorrendben növekvő számozással (*met1-met5*) nevezték el, a kromoszómákra betérképezték a sérülések helyét, de nem azonosították a sérült géneket. Schweingruber és mtsi (1998) szintén izoláltak metionin hiányos *Schiz. pombe* mutánsokat, melyeket az összetévesztés elkerülése végett *met6*-tól kezdtek számozni hasonló logika alapján.

Kérdés, hogy ha metioninból a transz-szulfurilációs anyagcsereúton közvetlenül nem keletkezik cisztein, akkor a metionin mégis hogyan hasznosul a hasadóélesztőben, a metionin kénatomja hogyan lép be a hasadó élesztő kén anyagcseréjébe, milyen anyagcsereút játszik ebben szerepet.

2.4.4. A kén-metabolizmus szabályozása

A metionin és cisztein bioszintézise feedback enzimszabályozás alatt áll. A szulfát-redukciót és a kéntartalmú aminosavak szintézisét elsősorban a végtermékek – a cisztein és a metionin –, a SAM és a metionil-tRNS szabályozzák.

A szabályozás feltehetően nem egyes enzimeket érint. A szulfátredukciós anyagcsereút, illetve az acetilezési és szulfhidrilezési reakciók enzimeit "met-I enzimsoporthnak" nevezik és úgy tűnik, itt az egész csoportra kiterjedő koordinált enzimszabályozás nyilvánul meg (Cherest et al., 1971, Surdin-Kerjan et al., 1976). Más szerzők szerint (Dott és Trüper, 1978; Heinzel és Trüper, 1978; Heinzel et al., 1979) azonban a koordináció a szulfát-permeázra, az ATP-szulfurilázra, a PAPS-reduktázra és a szulfít-reduktázra nem érvényes. Az APS-kináz bioszintézisét a metionin nem befolyásolja.

A metionin és az S-adenozil-metionin (SAM) hatásának vizsgálatai azt mutatják, hogy a met-I-enzimsoporth metionin okozta gátlásáért a metionin SAM-má alakulása felelős, vagyis a metionin ilyen módon fejt ki represszálo hatást (Thomas et al., 1988). A vad típusú élesztőknek minimál táptalajban metionint adagolva a SAM és a metionin mennyisége

növekedett, míg SAM hozzáadása csak a SAM mennyiségének növekedését okozta (Cherest, 1973, Jones és Fink, 1982).

Ono és mtsi (1996) eredményei szerint az OAS (O-acetilszerin) pozitív effektorként egy koordinált indukciót vált ki a szulfát-asszimiláció enzimeinél, a cisztein illetve annak metabolitjai pedig gátló hatással vannak a szulfát-asszimilációs enzimekre.

Transzkripció szinten három pozitív regulátor fehérjét írtak le a *S. cerevisiae*-ben, amelyeket a *MET4*, a *CBF1* és a *MET28* gének kódolnak.

A *MET4* gének úgy tűnik, kulcsszerepe van az egész szulfát-asszimilációban. A *met4* mutánsok nem tudják hasznosítani a szerves kénvegyületeket (Marzluf, 1994) és a ciszteint, továbbá metionin auxotrófok (Thomas et al., 1992). A *met4* mutánsokban a szulfát transzport nem működik, továbbá a *MET2*, *MET3*, *MET5*, *MET10*, *MET14*, *MET16*, és *MET25* gének nem íródnak át (Mountain et al., 1993, Thomas et al., 1992a).

A kénmetabolizmusban résztvevő számos gén transzkripcióját a *CBF1* gén által kódolt *Cbf1p* fehérje szabályozza. Kimutatták, hogy a fehérje nagymértékben befolyásolja a *MET16*, a *MET14* és a *MET10* gének expresszióját és a szulfát-permeáz aktivitását (Thomas et al., 1992a). A *cbf1* mutánsban nagymértékben csökkent az említett gének expressziója. A *MET25* és a *MET3* gének expressziója *cbf1* mutánsban csak a felére csökkent (Kuras és Thomas, 1995). Ez azt bizonyítja, hogy a *CBF1* gén mellett egyéb transzkripció regulátorok is fontos szerepet játszanak a *MET* gének szabályozásában.

S. cerevisiae esetében a *MET28* gén kénanyagcserében betöltött regulátor szerepéről számoltak még be, amely szintén a *MET* gének szabályozásában nyilvánul meg. A *met28* mutáns szelenát rezisztens, valamint metionin és cisztein auxotróf (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997). A mutáns törzsben a *MET3*, *MET10*, *MET14* és *MET16* gének transzkripciója csökkent (Kuras et al., 1996).

A három regulátor fehérjénél bebizonyították, hogy azok egy komplexként kötődnek a *MET* gének promoter régiójához (Kuras et al., 1996).

2.4.5. Szelenát rezisztencia és a szulfát hasznosítási képesség összefüggése

A szelenát (SeO_4^{2-}) a szulfát (SO_4^{2-}) toxikus analógja, azaz a szelenátot a szulfát-permeáz transzportálja a sejtbe és a szulfát asszimilációs anyagcsereút enzimei a szulfáttal analóg módon szelenitté redukálják. A szelén-tartalmú analógok a kén metabolizmus egy sor lépésének szubsztrátjai, a szulfát felvételtől egészen az aminosav szintézisig (Arst, 1968).

A szelenit toxikus hatása révén bizonyos koncentrációban már letális hatást fejt ki. A sejtekben működő detoxifikációs folyamatok során, például fitokelatinok segítségével elemi szelén is képződhet, ami a fehérjékben beépül a kén atom helyére és ezzel gátolja azok normális működését (Lauchli, 1993). Egyéb toxikus vegyületek is transzportálódhatnak a szulfát-permeáz segítségével, mint például a kromát (CrO_4^{2-}), de azok a szulfát-redukciós anyagcsereúton nem haladnak tovább, közvetlenül fejtik ki gátló hatásukat.

Több mikroorganizmusnál (Hussey et al., 1965; Pardee et al., 1966; Arst, 1968; Buxton et al., 1989; Smith, 1995, de Lucas et al., 2001), de magasabbrendű növényeknél (Shibagaki et al., 2002) is izoláltak már szelenát rezisztens mutánsokat, amelyek a szulfátot nem tudták hasznosítani. A rezisztencia hátterében a szulfát-permeáz, vagy a szulfát sejten belüli aktiválásában részt vevő ATP-szulfuriláz, APS-kináz vagy a redukciót végző PAPS-reduktáz enzim sérülése állt, sőt az említett gének transzkripció aktivátorainak sérülése is áttételesen inaktiválhatja a felsorolt enzimeket.

Hussey és mtsi (1965) olyan *Aspergillus nidulans* mutánsokat jellemeztek biokémiai szempontból, amelyek az exogén szulfátot nem tudták szulfittá redukálni. A szelenát és kromát toxikus analógok segítségével megállapították, hogy a mutánsok az extracelluláris szulfáttól az intracelluláris szulfitig tartó anyagcsereút négy enzimének génjeiben sérülhettek (Arst, 1968).

Aspergillus niger és *Aspergillus nidulans* szelenát-rezisztens törzseket két komplementációs csoportba osztották. sB^- jelölést használtak azokra a szelenát-rezisztens törzsekre, amelyek a szulfát-permeáz enzimben sérültek, és emiatt kromátra (CrO_4^{2-}) is rezisztensek voltak. A szintén szelenát-rezisztenciát mutató sC^- jelű komplementációs csoport az ATP-szulfurilázban sérült, és ezek a mutánsok kromátra érzékenyek maradtak. Klónozták az *Aspergillus nidulans* sC^+ gént, plazmidba építették be és így az ATP-szulfuriláz gén bejuttatásával komplementálni tudták az *Aspergillus niger* sC^- mutánsokat (Buxton et al., 1989).

A szulfát transzportban sérült *Salmonella typhimurium* mutánsok is a szelenáton kívül kromátra is rezisztensek voltak (Pardee et al., 1966; Dreyfuss, 1964).

S. cerevisiae törzseknél szintén izoláltak szelenát- és kromát-rezisztens mutánsokat, amelyek a szulfát transzportban szerepet játszó *SUL1* génben sérültek (Smith, 1995). A *MET3* (ATP-szulfuriláz), *MET14* (APS-kináz) és *MET16* (PAPS-reduktáz) génekben sérült mutánsok fenotípusa is szelenát rezisztens (Thomas és Surdin-Kerjan, 1997).

2.4.6. *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgombák kén-hidrogén termelésének szabályozása molekuláris klónozással

Több kutatócsoport vizsgálta sörélesztőknél a molekuláris klónozás lehetőségét a törzsek kén-hidrogén termelésének csökkentésében. "Fiatal" sörökben, hasonlóan az úborhoz, gyakran magas a H_2S tartalom, melynek mennyisége az érlelés során csökken, de az érlelési idő rövidítése, vagy a túl magas H_2S szint elkerülése érdekében foglalkoznak a törzsek kén-hidrogén termelésének visszaszorításával.

Tezuka és mtsi (1992) a H_2S termelést gátló *NHS5* gént klónozták a *S. cerevisiae* X2180-1A génkönyvtárból, majd megfelelő vektorba építve alsó-erjesztésű sörélesztőben expresszálták. A klónozott *NHS5* gén a cisztationin- β -szintáz enzim termelését befolyásolta, amely a homocisztein cisztationinná történő konverzióját katalizálja.

A *NHS5* gén expressziójával az élesztő H_2S termelését sikeresen csökkentették, míg az élesztő egyéb fermentációs tulajdonságai nem változtak.

Omura és mtsi (1995) szintén sörélesztőben a *MET25* gént klónozták és a konstitutív glikolitikus promoter szabályozása alá helyezték. A *MET25* gén a homocisztein-szintáz enzim termeléséért felelős, ez az enzim gyakorlatilag a H_2S -t (szulfid iont) használ a metionin szintéziséhez. Feltételezték, hogy ez a gén kulcsfontosságú szerepet játszik a felesleges H_2S termelésben.

A *MET25* gén expressziója a transzformánsoknál többszörösére emelkedett és a szülői törzsekhez viszonyítva körülbelül tizedannyi H_2S -t termeltek.

Hansen és Kielland-Brandt (1996) a sörélesztő szulfít termelését akarták megnövelni annak antioxidáns és aromastabilizáló hatása miatt a *MET2* gén inaktiválásával. Hipotézisük az volt, hogy a *MET2* gén által kódolt homoszerin-acetiltranszferáz gátlásával a szulfid akkumulálódik a sejtben, ami a kén asszimilációs út derepresszálásán keresztül szulfít akkumulációt idéz elő. Ha a vizsgált tetraploid törzsnél csupán egyetlen *MET2* gén maradt aktív, a szulfít termelés megnövekedett. Amennyiben mind a négy *MET2* gén kópiát inaktiválták, még erősebben megnőtt a szulfít mennyisége. Mindkét esetben azonban a szulfít termeléssel párhuzamosan megnövekedett a transzformánsok H_2S termelése is.

2.5. A borok kéntartalmú illékony vegyületei

Műszeres analitikai módszerekkel eddig közel negyven kéntartalmú anyagot mutattak ki a borban (Rapp és mtsi, 1985, Rauhut, 1993). Csak néhány kénvegyület esetében ismert a keletkezés és a bor illatának kialakításában játszott pontos szerep. Bizonyos S-tartalmú komponensek jelenléte, vagy koncentrációváltozásuk okozta szinergikus és antagonisztikus hatásokat még alig vizsgálták.

A kénhidrogénes szag egy olyan borhiba, amely már több mint 300 éve ismeretes. A német szakirodalom a "böchser" (bakszag) kifejezést használja, 1672-ben J.D. Portzt a következőképpen definiálta ezt a hibás aromát: "A rajnai bor, különösképpen a Bacharacher kémiai természete", "...egy sajátos illata a bornak, amely a bakszagra hasonlít, innen származik az elnevezése is" (Lemperle, 1981).

A kénhidrogénes illathiba kialakulásáért a borban elsősorban maga a H_2S , de a kénhidrogén további reakcióiból származó illékony kén-vegyületek is felelősek.

Az illékony kéntartalmú vegyületek közé nagyon erős aromaanyagok tartoznak, amelyek kívánatos, de ugyanakkor nem kívánatos illatjegyek kialakításában is részt vehetnek (Schutte, 1975). Az illékony kéntartalmú vegyületekre továbbá jellemző a rendkívül alacsony szagküszöbérték, nanogrammmnyi és mikrogrammmnyi mennyiségük már elegendő lehet illat- és ízhibák kialakításához. Ilyen kénvegyületek alakítják ki sok élelmiszer (pl. hagyma, fokhagyma, káposzta, spárga, főtt- és sült hús, hal, sajt és feketebizli) jellegzetes aromáját is (Rauhut et al., 1995).

Egyes olyan S-tartalmú komponensek szaglási küszöbértékeit adja meg az 1. sz. táblázat, amelyeket a bor aromájára való hatásukkal és a kénhidrogénes hiba keletkezésével kapcsolatban gyakran tárgyalnak (Rauhut et al., 1995; Goniak és Noble, 1987). A borok aromája szempontjából fontos kénvegyületek borban eddig kimutatott koncentrációját is feltüntettük.

A H_2S szaglási küszöbértéke 10-80 $\mu g/l$ tartományban van és így a metil-merkaptán ($MeSH$) és etil-merkaptán ($EtSH$) küszöbértékei fölé esik. A merkaptánok amúgy is a "böchser"-keletkezés okozásának alapos gyanújában állnak. Nagyobb szagküszöbértékük van a diszulfidoknak, a merkaptánok oxidációs termékeinek. A gyenge kénhidrogénes szag ezért levegőztetéssel eltávolítható, mivel a merkaptánok diszulfidokká oxidálódnak. Az erős merkaptán okozta szag ilyen módon már nem távolítható el, mivel a képződött diszulfid-

koncentrációk már a szagküszöbérték fölé esnek. Ez esetben az érzékszervi hatás csupán megváltozik, mivel a diszulfidok másként hatnak az aromára, mint a merkaptánok (lásd 1. sz. táblázat).

1. táblázat Illékony kénvegyületek érzékszervi hatása, szaglási küszöbértéke és koncentrációja borokban (Rauhut et al., 1993)

S-vegyületek	Érzékszervi benyomás	Szagküszöbérték ($\mu\text{g/l}$)	Koncentráció ($\mu\text{g/l}$)	Borfajta
Kénhidrogén (H_2S)	záptojás	10-100	<1,5 20-80	normál bor újbor
Dimetil-szulfid (DMS)	spárga	25-60	5-44 <910	fehérbor ausztrál vörösbor
Metil-merkaptán (MeSH)	záptojás vagy káposzta	2-10	nyomokban-8	fehérbor
Etil-merkaptán (EtSH)	gumi, hagyma	1,1	nyomokban-30	vörösbor
Dimetil-diszulfid (DMDS)	főtt káposzta, hagymaszerű	29	-	-
Dietil-szulfid (DEDS)	égett gumi, fokhagyma	4,3	-	-
Tioecetsav-S-metilészter (MeSAc)	sajtszerű	(sörben) 300 10-40	2-16	fehér- és vörösbor
Tioecetsav-S-etilészter (EtSAc)	kénes	(sörben) 40 10-30	0-4	fehér- és vörösbor
3-(metiltio)-1-propanol (metionol)	főtt burgonya	(sörben) 200	145-520 500-6300	fehér- és vörösbor fehér- és vörösbor
2-metiltetrahydro-tiofen-3-on			7-45 92-167 <60-1040	fehérbor vörösbor fehér- és vörösbor

A metil- és etil-merkaptánnál lényegesen nagyobb a szagküszöbértéke a dimetil-szulfidnak (DMS), a metionolnak (3-metiltio-propanol-1), a tioecetsav-S-metilészternek (MeSAc) és a tioecetsav-S-etilészternek (EtSAc).

A metil-merkaptán (MeSH) nyomnyi mennyiség és $8 \mu\text{g/l}$ között, az etil-merkaptán (EtSH) nyomokban és $30 \mu\text{g/l}$ között fordul elő a borokban. Mindkét merkaptánt különféle aromahibákat okozva mutatták ki borokban (Rauhut és Kürbel 1994b).

A MeSH különféle szervetlen és szerves elővegyületekből is képződhet az élesztő metabolizmusa során. A szintézis menete ezidáig még nem teljesen ismert. Az EtSH hagyma- vagy gumiszerű szagot okoz és fehérborban a szagküszöbértéke $1,1 \mu\text{g/l}$ (Goniak és Noble

1987). Rankine (1968) valószínűsíti, hogy a H_2S acetaldehiddel vagy etanollal lejátszódó reakciójában keletkezik. Ezt Rauhut (1996) cáfolja, kísérleti eredményei szerint ezekben a reakciókban szén-diszulfid (CS_2) és egyéb S-tartalmú aromák keletkeznek.

A dimetil-szulfid (DMS) aromája a főtt spárgára, gabonára vagy melaszra emlékeztet. Nagyobb koncentrációkban a DMS vélhetőleg az érett buké és a késői borok aromájának kifejlődésében vesz részt (Simpson, 1979). A tárolási idővel és a tárolás hőmérsékletének emelkedésével a DMS-koncentráció nő (Marais, 1979). Fehér asztali borokban 0-474 $\mu\text{g/l}$ mennyiségben mutattak ki DMS-t (Loubser és Du Plessis, 1976), egyes ausztráliai Cabernet Sauvignon borokban pedig rendkívül nagy DMS-koncentrációt (910 $\mu\text{g/l}$ -ig) mértek (De Mora et al., 1987).

A tioecetsav-S-metilésztert 2-16 $\mu\text{g/l}$ mennyiségben mutatták ki borokban (Leppänen et al., 1980). Az etil-észter koncentrációja jóval alacsonyabb ennél (nyomnyi mennyiségtől 4 $\mu\text{g/l}$ -ig terjed). A tioacetát feltehetőleg merkaptánok acetyl-CoA-val való enzimmel katalizált reakciójában keletkezik, amely folyamat analóg az ecetsav-észterek keletkezésével az élesztő-anyagcsere során (Thurston et al., 1982).

A metionolt az erjedés során az Ehrlich-mechanizmus szerint az élesztő képezi metioninból. A metionol aromája koncentrációjától függően főtt burgonyára (Baumes et al., 1986), édes levesre vagy húsrá (Williams, 1982) emlékeztet. Vizsgálatok szerint a fehérborok 507-998 $\mu\text{g/l}$, míg a vörösborok jóval nagyobb mennyiségben, 1363-2314 $\mu\text{g/l}$ koncentrációban tartalmaznak metionolt. Mindazonáltal a metionol a bor egyik fő aromakomponense. Újabb kutatások 500-630 $\mu\text{g/l}$ metionol-tartalomról számolnak be. Rossznak minősített borok különféle aromajegyekkel nagyobb mennyiségű metionolt tartalmaznak (Baumes et al., 1986).

A 2-metil-tetrahidrotiofén-3-on-t 1040 $\mu\text{g/l}$ koncentrációig mutatták ki borokban. Ennek a kéntartalmú összetevőnek a keletkezése és érzékszervi jelentősége a borban még nem tisztázott.

2.5.1. A kénhidrogén és egyéb káros kénvegyületek termelődése az erjedés során

A kénhidrogén, az asszimilációs szulfát redukció végterméke, az erjedés során keletkezik, szagküszöbértéke a borban 10-100 µg/l tartományban mozog. Újborban 20-30 µg/l koncentrációban egy jellegzetes "erjedési bukét" okoz.

Az erjesztés során termelődött mennyisége elsősorban az élesztőtörzs genetikai adottságaitól, az élesztő nitrogén ellátottságától, a must összetételétől és az erjesztés körülményeitől függ.

2.5.1.1. Az élesztő genetikai adottsága a kén-hidrogén termelés szempontjából

Az erjedés alatti H₂S-képződést erősen befolyásolja a vizsgált élesztőtörzsek kénanyagcseréjében szereplő gének szabályozottsága. Ezt bizonyították Acree és mtsi (1972), Eschenbruch (1974 és 1978), Eschenbruch és mtsi (1978), Vos és Gray (1979), valamint Romano és Suzzi (1992) kísérleti eredményei. A vadélesztők sokkal hajlamosabbak kénhidrogén és egyéb káros aromák képzésére, mint a borélesztő törzsek, de a kereskedelembe kapható fajélesztők is eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek e tekintetben. Romano és Suzzi (1992) kimutatták, hogy a termelt H₂S mennyisége jellemző az adott élesztőtörzsrre. Biggy agaron való elszíneződés és a kén-dioxid termelési ráta alapján különböző H₂S-fenotípusokat állítottak fel.

2.5.1.2. Az élesztő nitrogén ellátottsága és ennek befolyása a kén-hidrogén termelésre az erjesztés során

A megnövekedett H₂S-képződést befolyásoló további tényező a mustban az élesztő által asszimilálható nitrogén hiánya. A mustok össznitrogén tartalma 60-2400 mg/l között változik (Henschke és Jiranek, 1993), de a mustban található N-források csupán egy része asszimilálható az élesztő számára. Egy teljes erjedéshez 160-240 g/l cukortartalomhoz minimum 140 mg/l szabad α-aminonitrogén szükséges mustban (Bely et al., 1990). Amennyiben a mustban az asszimilálható nitrogénkoncentráció 250 mg/l alatt van, általában már előjönnek az erjesztési és H₂S-termelési problémák (Rauhut és Kürbel, 1994a, b).

Régóta kutatják erjesztési problémák kiküszöbölésére és a fokozott H₂S-képződés elkerülésére nitrogén adagolását, diammonium-hidrogén-foszfát (DAHP) vagy ammónium-szulfát formájában (Vos 1981, Vos és Gray 1979). Az Európai Unió borvidékein is engedélyezik mustban a nitrogén-elégtelenség kiegyenlítésére "erjesztősók" adagolását 0,3 g/l

koncentrációig (max. 0,3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ vagy $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Főleg melegebb termőterületeken alkalmazzák, ahol gyakorta kevés az asszimilálható nitrogénforrás a mustokban (Monk, 1986).

A H_2S (illetve a szulfid) a kéntartalmú aminosavak bioszintézisének kiindulási terméke, ezáltal egyfajta "összekötőkapocs" az élesztő kén- és nitrogén-anyagcseréje között. Nem véletlen tehát, hogy az élesztő által termelt H_2S mennyiségét mind a kén-, mind pedig a nitrogén-anyagcsereút befolyásolja (Rauhut, 1996).

Az élesztő az aminosavak, peptidek, proteinek és nukleinsavak bioszintéziséhez elsősorban ammóniumot (NH_4^+) használ, amit az NH_4^+ -tartalékból (pool), vagy a glutamátból nyer transzamilálás során. Mustok ammónium tartalma 0-146 mg/l között változik, a glutamát tartalom átlagosan kb. 151 mg/l (Henschke és Jiranek, 1993). Minden nitrogén-tartalmú vegyület, amelyet az élesztő felhasznál, ammóniummá vagy glutamáttá alakulhat. Az élesztő a mustban található aminosavak kb. egy harmadát használja fel a szaporodásához. Nem botritiszes szőlők mustjainak aminosavtartalma 3000 mg/l körül van (Dittrich és Sponholz, 1975), de szárazabb években, melegebb termőterületeken vagy botritiszes szőlők esetében az aminosavtartalom sokkal alacsonyabb lehet.

Henschke és Jiranek (1991) N-forrásként egyedül ammóniumsókat tartalmazó modell-oldatban erjesztési kísérletek során kimutatták, hogy a H_2S -képzés az erjesztés minden fázisában az ammóniumtartalom függvényében változik. A nitrogén-éheztetés következtében megnövekvő H_2S -képzést ammóniumon kívül a cisztein, prolin, lizin és treonin kivételével egyéb aminosavakkal vissza lehetett szorítani.

A H_2S -termelést tekintve az erjesztés során 2 fázis figyelhető meg. Az első, intenzívebb fázis az élesztő szaporodása alatt és után észlelhető. Minimumát 30-40 g/l maradék cukortartalomnál éri el. A második fázis kb. 15 g/l maradék cukortartalomnál lép fel. A N-éheztetés során az első fázisban adagolt ammónium a H_2S -képzés csökkenését idézi elő, míg a második fázisban adagolt ammóniumnak semmilyen hatása nincs a H_2S -képzésre (Henschke és Jiranek, 1991). Thomas és mtsi (1993a) kísérleti erjesztések során szintén többnyire két fázisban figyelték meg a H_2S -termelést, ami az első fázisban mindig intenzívebb volt, mint a másodikban. Az első fázisban történő H_2S -termelés az élesztőtörzstől függött, ezzel szemben a második fázisban termelődő H_2S mennyiségére a must tápanyag összetétele volt jelentős hatással (Henschke és Jiranek, 1991).

Az asszimilálható nitrogén hiánya a nitrogén-vegyületek csökkent mértékű szintézisét okozza, egyben a kéntartalmú aminosavak elővegyületeinek, az O-acetilszerinnek és az O-acetilhomoszerinnek a hiányát. Ha kevés az O-acetilszerin és az O-acetilhomoszerin, csökken a metionin képzés, illetve annak következményeként a metabolitjai, a SAM és a metionil-tRNS képzés is (5. ábra). Ezen metabolitok csökkenő mennyiségének reguláló hatása által elsősorban a szulfít-reduktáz derepressziója váltódik ki, hogy a metionin termelés erősödjön. Ez vezet a H₂S túltermeléshez. Ammóniumionok hozzáadása egy gyors *de novo* O-acetilszerin és O-acetilhomoszerin szintézist tesz lehetővé. A felesleges szulfid kéntartalmú aminosavak képzésére használódik fel. A metionin és annak metabolitjai (SAM és metionil-tRNS) felhalmozódásával az asszimilációs szulfát-redukció enzimek és a kapcsolódó anyagcsereutak represszálódnak és ezáltal az erős H₂S-termelés leáll (Henschke és Jiranek, 1991).

2.5.1.3. Elemi kén illetve egyéb kéntartalmú szermaradványok a mustban

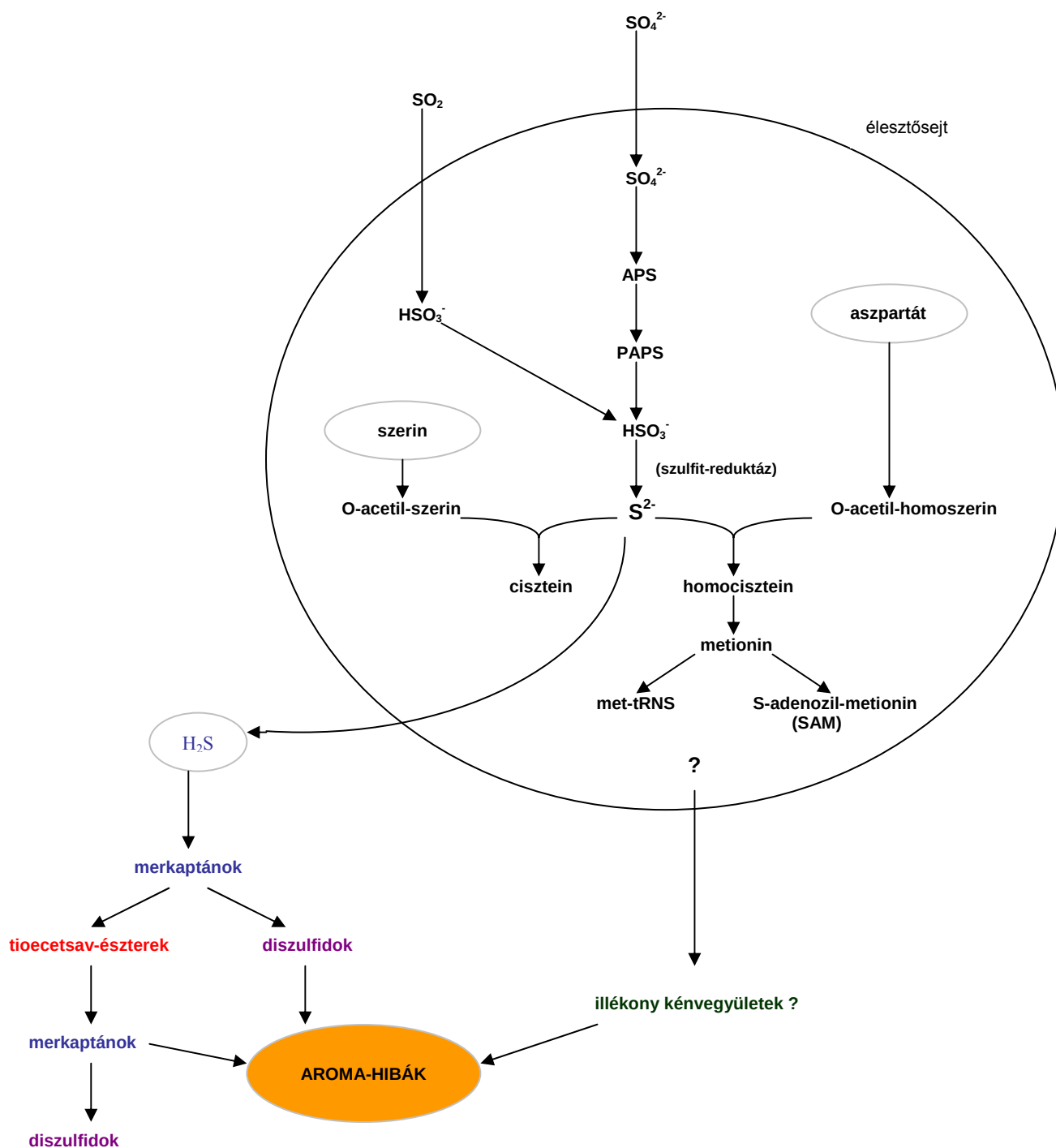
A kén-hidrogén és az abból keletkező kénvegyületek képződését nagy mértékben befolyásolja az elemi kén mennyisége a mustban, illetve további szerves és szervetlen kéntartalmú peszticidek származékai és bomlástermékei.

Elemi ként a valódi lisztharmat leküzdésére már a múlt század közepe óta használnak a növényvédelemben. Mivel a kén az emberre és az állatokra gyakorlatilag ártalmatlan még ma is használatos az ökológiai szőlőtermesztésben is (Hoffmann et al., 1995). Már régóta ismert, hogy a kén-maradékokból az élesztő anyagcsereje által H₂S képződhet. Elemi kénből a H₂S-típusú borhiba kialakulását Wenzel és mtsi (1980), Wenzel és Dittrich (1978), valamint Schütz és Kunkee (1977) behatóan vizsgálták.

Több mint 30 éve gyanítják, hogy a kéntartalmú szerves fungicidek is okozhatnak "bakszag"-képződést. Bár átfogó vizsgálatokat folytattak, csak egyes esetekben tudtak összefüggést megállapítani bizonyos növényvédőszer alkalmazása és a kén-hidrogénes szag fellépése között. Schmitt és mtsi (1986) bevezetőjükben egy értékes áttekintést adnak erről a problémáról.

A peszticidek erős szagú kéntartalmú anyagokká történő lebomlása végbemehet enzimikus vagy nem enzimikus úton. Egy jellegzetes és fokozott aromahibát okozott például a 70-es évek végétől a 80-as évek közepéig az európai borvidékeken az Orthen kereskedelmi nevű inszekticid (rovarölő) alkalmazása, amelynél a hibát az inszekticid tisztán kémiai lebomlása okozta. A rovarölő szerben lévő acephat nevű hatóanyag igen lassan hidrolizált a bor tárolása során metil-merkaptán felszabadulásával. Ez a merkaptán rendkívül alacsony

szagküszöbértéke következtében (0,02-2 $\mu\text{g/l}$ vízben és 10-15 $\mu\text{g/l}$ borban), a bor poshadt és sajtszerű szagát okozza. A hibás szag kiváltásához elegendő acephat koncentráció jóval alatta van a szőlő védelméhez megengedett legnagyobb értéknek. Az Orthen szakszerű alkalmazása ellenére nagy gazdasági károkat okozott az általa kialakított kellemetlen aroma miatt, ezért használatát a szőlőtermesztésben be is tiltották (Rauhut et al., 1995).



5. ábra Illékony kéntartalmú vegyületek képződésének sematikus ábrája (Lambrechts és Pretorius, 2000)

2.5.1.4. A kénhidrogénes aromahiba eltávolítása borból

Würdig szerint (1989) a "böchser" elhatárolása egyéb borhibáktól azáltal lehetséges, hogy minden ebbe tartozó aromahiba körülbelül 10 mg/l CuSO_4 hozzáadásával többnyire igen rövid idő alatt eltűnik oly módon, hogy a bor eredeti karaktere újra egyértelműen érvényesül. A réz-szulfát hozzáadása egy borászati kezelési eljárás, amelynek lényege a rézionok kénhidrogénnel és merkaptánokkal való reakciója réz-sókká, amelyek azután leválaszthatók. Egy következő kezelési lépésben azután a fölösleges rezet újra eltávolítják.

Bebizonyosodott azonban, hogy nem mindenfajta "böchser" szüntethető meg eredményesen a réz-szulfátos kezeléssel. Valószínűsítik, hogy a réz-szulfátos kezeléssel nem eltüntethető szulfidos-merkaptános aromahiba a H_2S vagy a merkaptánok már bekövetkezett reakciójára vezethető vissza, amelyekben további kéntartalmú illékony vegyületek keletkeztek, amelyek kémiai szerkezetük miatt már nem képesek a réz-szulfáttal reakcióba lépni. Erősen kénhidrogénes hibás borokban igen magas tioecetsav-észter koncentrációt mutattak ki, több mint tízszeresét annak a koncentrációnak, amit a borokban az erjedés során normális H_2S -termelés esetén észleltek. A vizsgálat szerint a tioecetsav-S-etilészter képződés visszavezethető a megnövekedett H_2S -képzésre, különösen az erjedés végén. Mivel a bor réz-szulfátos kezelésével csak a H_2S -t és a merkaptánokat lehet eltávolítani, azonban a tioecetsav-észterek koncentrációja nem változik, a borok tárolása során keletkező kénhidrogénes (szulfidos-merkaptános) borhiba oka a tioecetsav-észterek lassú hidrolízise lehet, ami újra a nagyon intenzív szagú merkaptánok felszabadulásával jár, melyeknek már nyomnyi mennyisége is elegendő a hibás aroma újbóli megjelenéséhez (5. ábra). Modellkísérletekkel kimutatták, hogy a tioecetsav-S-metilészter és a tioecetsav-S-etilészter lassú hidrolízisével valóban metil- ill. etil-merkaptán keletkezik (Rauhut és Kürbel, 1994a). Esetlegesen számolni lehet azzal is, hogy a kénhidrogénes hibás aroma kialakításában további, eddig még nem kimutatott kénvegyületek is részt vehetnek.

Végül fontos leszögezni, hogy a H_2S és illékony kéntartalmú származékainak képződését elsősorban az erjesztésnél használt élesztő-színtenyészet, illetve a spontán mikroflórában uralkodó élesztők befolyásolják. Miután látható, hogy a hibás aroma nem tüntethető el teljes mértékben és hosszú időre megbízhatóan az erjesztést követő réz-szulfátos kezeléssel, ezért igen fontos, hogy megfelelő starter törzseket használjunk a borkészítés folyamata során, amelyek kén-anyagcseréjük által kevésbé hajlamosak kénhidrogén termelésére.

A borászatban a malo-etanolos fermentáció bevezetése esetén számolnunk kell a már a bevezetésben is tárgyalt nehézséggel, hogy a *Schizosaccharomyces pombe* törzsek káros mennyiségben termelnek kén-hidrogént. Mivel látjuk, hogy az aromahiba eltűntetése nem lehetséges a fermentációt követő borászati kezelési eljárással, elsősorban olyan törzsek fejlesztésével érdemes foglalkozni, amelyek genetikai tulajdonságaik révén csökkent mértékű kénhidrogén termelésre képesek.

A *Schizosaccharomyces pombe* kénanyagcseréjével kapcsolatban kevés a publikált kutatási eredmény. Célom az volt, hogy doktori munkám során kutatási eredményeim közelebb vigyenek a *Schizosaccharomyces pombe* kénanyagcseréjének megértéséhez és olyan törzs fejlesztését céloztuk meg, amelynek kén-hidrogén termelése gátolt (csökkent mértékű), ugyanakkor jó almasavbontó aktivitással rendelkezik.

3. Célkitűzések

- (1) Kutatócsoportunk korábbi eredményeiből kiindulva rendelkezésemre állt számos *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* törzs szűrési vizsgálatával kapott, borászati szempontból fontos élettani jellemzője (szaporodási ráta, almasav-bontás, etanol-tolerancia, H₂S-termelés). Első lépésben ezeknek a törzseknek a RAPD-PCR analízisét, majd pedig a *Schiz. japonicus* törzsek bevonásával a teljes *Schizosaccharomyces* nemzetség rDNS analízisén alapuló molekuláris jellemzését tűztük ki célul. Arra kerestünk választ, hogy
- egyrészt a vizsgálatba vont *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* törzsek között, valamint fajon belül milyen hasonlósági csoportok különíthetők el molekuláris tipizálással,
 - a nemzetségen belüli vizsgálataink megerősítik-e az eddigi alfajok elkülönítésének jogosságát,
 - a törzsek élettani jellemzői (szaporodási ráta, almasav-bontás, etanol-tolerancia, H₂S-termelés) mennyiben korrelálnak a molekuláris tipizálás eredményeivel.
- (2) A kísérletes munka következő fázisában csökkent kén-hidrogén termelő törzsek előállítását céloztuk meg random mutagenézissel. Az alább felsorolt célokat tűztük ki:
- szulfát-asszimilációban sérült szelenát-rezisztens *Schiz. pombe* mutánsok indukálása és izolálása
 - a szelenát rezisztens mutánsok analízise: a mutáció stabilitásának vizsgálata, szelenát-tolerancia és szelén akkumuláció vizsgálata, komplementációs analízis
 - a vad típusú és mutáns törzsek különböző kénforrás hasznosítási képességének meghatározása
 - a mutánsok szulfát felvételének vizsgálata radioaktívan jelölt (³⁵S) szulfáttal, amellyel arra kerestünk választ, hogy a szulfát transzport, vagy pedig a szulfát redukciós út génjeit érintette-e a mutáció.
- (3) Célul tűztük ki a továbbiakban a kén-anyagcserében sérült mutánsok vizsgálatát abból a szempontból, hogy alkalmasak lehetnek-e a borászatban biológiai almasavbontásra. Itt a következő kérdésekre kerestünk választ:
- csökkent-e a mutánsok kén-hidrogén termelése a vad típusú törzsekhez képest,

- a vad törzsek eredetileg jó almasavbontó aktivitását befolyásolta-e a mutáció,
- az erjedési aromaszpektrumokban találunk-e eltérést a vad és mutáns törzsek között,
- érzékszervi tulajdonságaikban eltérnek-e a mutáns törzsekkel erjesztett borok.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Törzsek

Faj / Törzs	Jelölés	Genotípus	Származás
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	L. 975	h ⁺	CBS 7265 (Leupold törzs)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	leu1	h ⁺ <i>leu1</i>	GDU, a CBS 7265 törzs auxotróf mutánsa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	lys1	h ⁺ <i>lys1</i>	GDU, a CBS 7265 törzs auxotróf mutánsa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	leu1 lys1	h ⁺ <i>leu1 lys1</i>	GDU, a CBS 7265 törzs auxotróf mutánsa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NCYC 1945	h ⁺ <i>met3-1</i>	NCYC, a CBS 7265 törzs auxotróf mutánsa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	L. 972	h ⁻	CBS 7264 (Leupold törzs)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0-82	h ⁻ <i>ade5</i>	GDU, a CBS 7264 törzs auxotróf mutánsa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0-44	h ⁻ <i>arg4</i>	GDU, a CBS 7264 törzs auxotróf mutánsa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0-172	h ⁻ <i>leu3</i>	GDU, a CBS 7264 törzs auxotróf mutánsa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	0-121	h ⁻ <i>arg1 tyr1</i>	GDU, a CBS 7264 törzs auxotróf mutánsa
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: <i>var. pombe</i>)	LBG 1145		CBS
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: <i>var. acidevoratus</i>)	RIVE 4-1-1		RIVE
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: <i>var. mosquensis</i>)	RIVE 4-2-1		RIVE
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: <i>var. pombe</i>)	RIVE 4-4-2		RIVE
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: <i>var. pombe</i>)	RIVE 4-4-3		RIVE
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: <i>Schiz. mellacei</i>)	RIVE 4-5-1		RIVE
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: <i>var. malidevorans</i>)	RIVE 4-6-1		RIVE
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: <i>var. pombe</i>)	S 142		SZMC

Faj / Törzs	Jelölés	Genotípus	Származás
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: var. <i>pombe</i>)	C 4411	prototróf	CCY
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: var. <i>pombe</i>)	C 4413	prototróf	CCY
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: var. <i>malidevorans</i>)	C 4461	prototróf	CCY
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: var. <i>pombe</i>)	N 132		NCYC
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (korábban: var. <i>pombe</i>)	NY 315		MIMNGY
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	B 573	prototróf	BT, mustból izolálva
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	B 578	prototróf	BT, mustból izolálva
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	B 579	prototróf	BT, mustból izolálva
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	S 413		SZMC
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	S 702		SZMC
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	S 703		SZMC
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	NY 976		MIMNGY
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	SCHJ1		MBT
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> var. <i>japonicus</i>	C 4451		GDU, CCY, CBS 354
<i>Schizosaccharomyces japonicus</i> var. <i>versatilis</i>	C 4431		GDU, CCY, ATCC 9987
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	RIVE 4-2-1 <i>arg⁻/6-2</i>	<i>arg⁻/6-2</i>	RIVE
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	A/K 6/5	<i>ade6 arg⁻</i>	MBT (Geleta, 1996)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S 288c		MBT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	oenoferm		MBT

Törzsgyűjtemények rövidítései:

CBS: Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollandia
 CCY: Collection of Yeasts, Bratislava, Szlovákia
 BT: Borászati Tanszék, BKE-ÉK, Budapest
 GDU: Genetika Tanszék, Debreceni Egyetem, Debrecen
 MBT: Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék, BKE-ÉK, Budapest
 MIMNGY: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye, Budapest
 NCYC: National Collection of Yeast Cultures, Norwich, UK
 RIVE: Research Institut for Viticulture and Enology, Bratislava, Szlovákia
 SZMC: Szeged Microbiological Collection, Mikrobiológia Tanszék, SZTE

4.2. Táptalajok, oldatok

Komplett táptalaj (YEPD)

0,5 %	élesztőkivonat (Oxoid)
0,5 %	pepton (Oxoid)
1 %	glükóz
2 %	agarral egészítjük ki szilárd táptalaj esetén

Minimál táptalaj (MM)

0,5 %	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,1 %	KH ₂ PO ₄
0,05 %	MgSO ₄ ·7H ₂ O
1 %	glükóz
1 ml/l	vitaminkeverék (Wickerham féle)
2 %	agarral egészítjük ki szilárd táptalaj esetén

Ozmotikusan stabilizált minimál táptalaj (OMM)

MM táptalaj
0,6 M KCl

Minimal táptalaj kénforrás nélkül (MM-S⁻)

0,5 %	NH ₄ Cl
0,1 %	KH ₂ PO ₄
0,05 %	MgCl ₂ ·1H ₂ O
1 %	glükóz
1 ml/l	vitaminkeverék (Wickerham féle)
2 %	agarral egészítjük ki szilárd táptalaj esetén

Éheztető táptalaj (YED)

1 %	glükóz
0,5 %	élesztőkivonat (Oxoid)
2 %	agar

Spóráztató táptalaj (SPA)

0,1 %	KH ₂ PO ₄
1 %	glükóz
1 ml/l	vitaminkeverék (Wickerham féle)
2 %	agar

Wickerham féle vitaminkeverék

0,2	mg	fólsav
0,2	mg	biotin
40,0	mg	Ca-pantotenát
200,0	mg	inozitol
40,0	mg	nikotinsav
20,0	mg	p-aminobenzoészav
40,0	mg	piridoxin.HCl
40,0	mg	tiamin.HCl
20,0	mg	riboflavin
100	ml	desztillált vízben oldva

EMS-oldat

3 % EMS (etil-metán-szulfonát) oldat készítése foszfát-pufferral (pH=7,1)

MNNG-oldat

10 mg/ml acetonos MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidin) törzsoldatból foszfát pufferral (pH=7,1) 25 µg/ml koncentrációjú MNNG-oldatot készítünk.

Protoplasztáló enzimoldat

2 mg/ml *Trichoderma* enzim preparátum 0,9 M szorbitolban oldva (Lysing enzyme – Sigma)

PEG-Ca²⁺ oldat

25 % polietilénlikol 4000 (Serva)

0,1 M CaCl₂

”Breaking” puffer

2% v/v TritonX-100,

1% w/v SDS,

100 mM NaCl,

10 mM Tris-HCl,

1mM EDTA

[pH=8]

PCIA-keverék

pufferolt fenol, kloroform, izoamilalkohol 25 : 24 : 1 arányú keveréke

TE-puffer

10 mM TrisHCl

1 mM EDTA

10x PRC-puffer

500 mM KCl

100 mM TrisHCl (pH=9,0 25°C-on)

1 % Triton X-100

Szcintillációs koktél

Ultima Gold LSC cocktail (Packard Canberra Co., USA)

H₂S mérések oldatai

H₂S csapda: kadmium-hidroxid oldat, melyet a következőképpen készítettünk:

4,3 g/l 3CdSO₄·8H₂O + 0,6 g/l NaOH (desztillált vízben)

Amin reagens:

törzsoldat: 0,75 mól/l N,N-dietil-p-feniléndiamin-szulfát (Sigma)

11,3 [M] H₂SO₄-ban oldva

színreagens: a törzsoldat 20-szoros hígítása 9 [M] H₂SO₄-ban,

majd 1:12 arányban 60 w/w % FeCl₃ oldat hozzáadása

Molekulatömeg marker (elektroforézishez)

Boehringer Mannheim DNA Molecular Weight Marker VI.

4.3. Módszerek

4.3.1. Genomiális DNS izolálás (Hoffmann és Winston, 1987, módszere alapján változtatásokkal)

Egy éjszakás tenyészetből centrifugálással (4.000 g, 10 perc) kiülepítjük a sejteket, majd steril ionmentes vízzel mossuk. Kb. 100 mg sejttömeget Eppendorf csőbe helyezünk és 200 µl "breaking"-pufferben szuszpendáljuk. Hozzáadunk 200 µl PCIA-keveréket és 0.3 g üveggyöngyöt (átmérő: 0.45-0.50 mm), végül 3 percig vortexeljük az Eppendorf csöveket. Következő lépésben 200 µl TE-puffert adunk hozzá és újra vortexeljük, majd 5 percig 12.000 g-vel centrifugáljuk.

A felülső vizes fázist, ami a nukleinsavakat tartalmazza, egy új Eppendorf csőbe pipetázzuk, és 1 ml 96%-os etanollal a nukleinsavakat precipitáljuk. Óvatosan összerázzuk kézzel, majd mélyhűtőbe helyezzük 20 percre. A mélyhűtőből kivéve 3 percig 12.000 g-vel centrifugáljuk, majd az etanolt eltávolítjuk, a DNS pelletet vákuumszáritóban megszáritjuk és visszaoldjuk 50 µl 200 µg/µl RN-ázt (Sigma R-5503) tartalmazó TE-pufferben.

37°C-on történő 60 perces inkubáció után a DNS-t kicsapatjuk 100 µl 96%-os etanollal, centrifugáljuk, száritjuk és 50 µl TE-pufferben feloldjuk.

4.3.2. RAPD-PCR analízis

A kísérleteimben használt 10 nukleotidból álló random primerek felsorolása a 2. táblázatban található. (Az OPE-02 primer származása: Operon Technologies Inc., USA.)

2. táblázat A RAPD analízis során alkalmazott oligonukleotid primerek tulajdonságai (szekvencia, G+C % és a DNS-szállhoz való bekötődésük optimális hőmérséklete)

Primer jelölése	Nukleotid szekvencia (5'-3')	G+C %	t _{opt} [°C]
P1	5' GCA AGT AGC T 3'	50	36
P2	5' AGC GGG CGT A 3'	70	38
P3	5' CGC GTG CCC A 3'	80	42
OPE-02	5' GGT GCG GGA A 3'	70	37

A PCR reakciót 30 µl végtérfogóban kiviteleztek, egy "QUATTRO TC 40" PCR készülék használatával. A PCR-mix összetétele a következő volt:

50 mM KCl, 10 mM TrisHCl (pH=9.0), 0,1% Triton X-100, 2,5 mM MgCl₂,
250 µM dNTP-mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 µM primer,
2,5 µl genomiális DNS-oldat (kb. 1 ng DNS), 1,5 U Taq-polimeráz

A PCR reakció hőmérsékleti paraméterei:

5 percen keresztül 94°C-os denaturálással kezdődött, majd
35 cikluson keresztül DNS denaturálás: 94°C-on 30 másodperc,
primer kötés (annealing): a 2. táblázat szerinti t_{opt} -on 45 másodperc,
polimerizáció (extension): 72°C-on 45 másodperc.

A végső lánchosszabbítás: 72°C-on 7 percig tartott.

Az amplifikált DNS fragmentumok elektroforézises szeparálása: 2%-os agaróz gélen, 120 V feszültséggel. A fragmentumok festése etidium-bromiddal történt.

4.3.3. Ribotipizálás

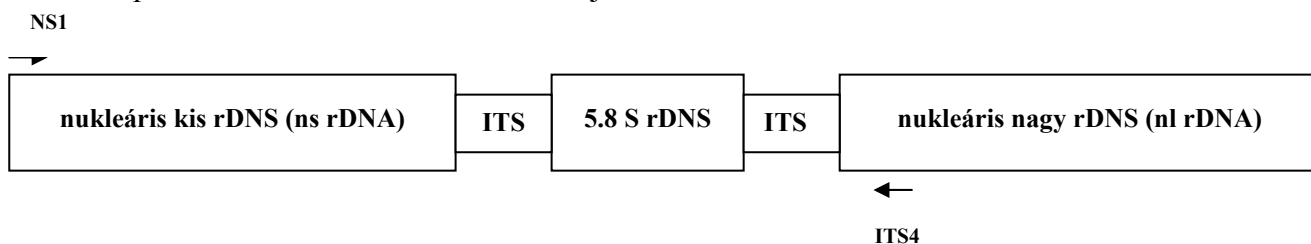
Vizsgálatom során az NS1 – ITS4 primerpárral határolt rDNS szekvenciát amplifikáltam és vettem restrikciós emésztés alá. Az amplifikálás eredményeként felerősítjük a nukleáris kis rDNS-t, az ezt követő ITS szekvenciát, az 5,8 S rDNS-t, a következő ITS-szekvenciát, majd a nagy nukleáris rDNS egy rövid szakaszát. Az enzimes hasítást a 3. sz. táblázat szerint négy különböző restrikciós endonukleázzal végeztem.

A PCR reakcióban alkalmazott primerek szekvenciái:

NS1: 5' GTAGTCATATGCTTGTCTC 3'

ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Az amplifikált rDNS szakasz sématisztikus rajza:



A PCR reakciót 30 µl végtérfogóban kiviteleztek, amely összetétele a következő volt:

50 mM KCl, 10 mM TrisHCl (pH=9.0), 0,1% Triton X-100, 2,5 mM MgCl₂,
100 µM dNTP-mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
0,2 µM NS3 primer, 0,2 µM ITS4 primer,
2,5 µl genomiális DNS-oldat (kb. 1 ng DNS), 1,8 U Taq-polimeráz

A PCR reakció hőmérsékleti paramétereit:

5 percen keresztül 95°C, majd

35 cikluson keresztül 95°C-on 30 másodperc, 61,5°C-on 30 másodperc, 72°C-on 3 perc.

Végző lánc hosszabbítás: 72°C-on 7 perc.

A restrikciós emésztés a 3. táblázatban felsorolt enzimekkel 37°C-on egy éjszakán át 10 µl végtérfogóban történt: 3 µl PCR termék, 1 µl 10x puffer, 0,2 µl (2 U) restrikciós enzim, (0,1 µl BSA) és 6 µl bidesztillált víz.

A fragmentumok elválasztása és vizualizálása: 1,5%-os etidium-bromidos gélen.

3. táblázat A ribotipizálásnál használt restrikciós endonukleázok

Restrikciós endonukleáz	Felismerő hely	Puffer	Optimális emésztési hőmérséklet
<i>ScrFI</i>	5'...CC▼NGG...3' 3'...GGN▲CC...5'	NE	37°C
<i>MspI</i>	5'...C▼CGG...3' 3'...GGC▲C...5'	B (BSA jelenléte ajánlott)	37°C
<i>HaeIII</i>	5'...GG▼CC...3' 3'...CC▲GG...5'	C (BSA jelenléte ajánlott)	37°C
<i>Sau3A</i>	5'...▼GATC...3'	A	37°C

4.3.4. A RAPD-PCR analízis és ribotipizálás adatainak feldolgozása és kiértékelése

Dendogramok készítése és az eredmények kiértékelése a “Molecular Analyst Fingerprint 2.0” software (Biorad, Applied Math[®]) segítségével történt. Molekulaméret markerek használatával a digitalizált képeket normalizáltuk, a gélképeket összehasonlítottuk és klaszter analízist végeztünk. Dendogramok készítéséhez a számítógépes programban az UPMGA analízis (unweighted pair-group arithmetic average) módszerét használtuk.

4.3.5. Szelenát minimális gátló koncentrációjának meghatározása

0,8 mM; 0,4 mM; 0,2 mM; 0,1 mM; 0,05 mM; 0,025 mM; 0,0125 mM; és 0,006 mM koncentrációkban Na₂SeO₄-ot tartalmazó YEPD táptalajokon vizsgáltuk a törzsek növekedését sejtszuszpenzióból csíkban leoltva a táptalaj felületére, majd 30 °C-on inkubáltuk. Azt a legkisebb koncentrációt kerestük (M.I.C. = Minimal Inhibitory Concentration), aminél a növekedést már gátolta az adott szelenát-koncentráció.

4.3.6. Kromát minimális gátló koncentrációjának meghatározása

2×10^{-2} M; 10^{-2} M; 5×10^{-3} M; $2,5 \times 10^{-3}$ M; $1,25 \times 10^{-3}$ M; 6×10^{-4} M; 3×10^{-4} M; $1,5 \times 10^{-4}$ M; 7×10^{-5} M koncentrációkban K_2CrO_4 -ot tartalmazó YEPD táptalajon néztük a törzsek növekedését szintén szuszpenzióból csíokban leoltva a táptalaj felületére. 30 °C-on inkubáltuk. Kerestük a M.I.C. értéket.

4.3.7. Mutagénkezelés UV-besugárzással, túlélési görbe felvétele, mutánsok izolálásához megfelelő mutagén dózis meghatározása

24 órás tenyészetből 10^7 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk. A szuszpenzió 10 ml-jét 2-2 ml-enként szétosztottuk Petri-csészékbe, és szétterítettük a csészék alján, majd besugároztuk. Besugárzás előtt az UV lámpát előmelegítettük, a szuszpenziókat pedig a lámpától 40 cm távolságra elhelyezve, különböző ideig sugároztuk be: 30, 60, 75, 90, 105 másodpercig. Kontroll minta párhuzamosan készült, de nem kapott besugárzást.

A kontrollból és besugárzott szuszpenziókból öttagú hígítási sort készítettünk, majd a hígítási sor megfelelő tagjaiból, (ahol körülbelül számolható telepszámot vártunk), 0,1 ml-t szélesztettünk YEPD táptalaj felületén. Minden besugárzásnál 3 hígításból szélesztettünk 2 párhuzamost (6. táblázat).

Értékelés: a telepek megjelenése szerint kb. az 5. napon. A túlélési arányokat számoljuk a kontroll alapján, amelyeknek telepszáma a 100%. Mutagén dózis meghatározása: túlélési görbét szerkesztünk és a mutánsok izolálásához azt a besugárzási időt választjuk, ahol a túlélés ~5-10%-os.

4.3.8. Szelenát-rezisztens mutánsok előállítása UV-besugárzással

A mutagén dózis meghatározásához az UV-besugárzással felvett túlélési görbe alapján az 5-10%-os túléléshez tartozó besugárzási időt választottuk: ez 105 másodperc volt.

A kb. 10^7 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziókat 2-2 ml-enként Petri-csészékbe osztva sugároztuk be. Az UV lámpa teljesítménye és a szuszpenziók lámpától mért távolsága ugyanaz, mint a 4.3.7. szerinti vizsgálatban. A besugárzást követően centrifugázással ülepítettük a sejteket, a felülúszót eltávolítottuk, és kiszélesztettük az összes kezelt sejtet 0,4 mM Na_2SeO_4 -tartalmú YEPD-táptalajon. 30 °C-on inkubáltuk. A szelenát tartalmú táptalajon megjelenő telepeket izoláljuk.

4.3.9. Mutagén-kezelés kémiai mutagénekkel, túlélés meghatározása

A használt mutagének:

- EMS (etil-metán-szulfonát) (3 %-os oldat)
- MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrozoguanidín) (25 µg/ml koncentrációjú oldat)

A kezelendő törzsekből 10^7 sejt/ml koncentrációjú szuszpenziót készítettünk. Lecentrifugáltunk a szuszpenziókból 2-2 ml-t, a felülúszót leöntöttük, és ráértünk 1-1 ml-nyi mutagén oldatot. A mutagénkezelést 10, 20, 30, 40, 50, 60 percig végeztük, majd leállítottuk 10%-os $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -tal a kezelt sejtsuszpenzió és a tioszulfát oldat 1:1 arányú összekeverésével.

Vizsgáltuk a %-os túlélés arányát a különböző erősségű kezeléseknél YEPD táptalajon.

4.3.10. Szelenát-rezisztens mutánsok genetikai stabilitásának vizsgálata

A szelenát rezisztens törzsekből 10^7 sejt/ml-es szuszpenziót készítettem. Ebből kacsacsíkokat húzva szélesztettem YEPD felületén úgy, hogy különálló telepeket kapjunk 30 °C-os 2 napos inkubációt követően. A kinőtt telepeket (4 petri csészén összesen kb. 500 telep) ezután 0,4 mM Na_2SeO_4 tartalmú YEPD tápagarra replikáztam és vizsgáltam, hogy a telepek hány százaléka nő ki a gátló anyagot tartalmazó táplemezen 30 °C-os inkubációt követően.

Két szelenát rezisztens törzs esetében (B 579 Se^R -2 és 0-82 Se^R -2), melyeket a későbbi kísérletek folytatásához szelektáltunk, nagyobb sejtszámmal, 5×10^4 sejttel back mutációs vizsgálatot végeztem. Itt megfelelő sejtsuszpenzióból 5×10^4 sejt szélesztését és a különálló, számolható telepek növekedésének tesztelését végeztem 0,4 mM Na-szelenát tartalmú táplemez felületén.

4.3.11. Szelenát-rezisztens mutánsok szulfát hasznosításának vizsgálata

Az összes szelenát rezisztens mutáns törzs szaporodását vizsgáltuk kénforrásként egyedül 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot tartalmazó szilárd MM táptalajon, hogy teszteljük a szulfát hasznosítási képességüket. Pozitív kontrollként 0,01% ciszteint tartalmazó tápagaron vizsgáltuk a szaporodást. Negatív kontrollként kénforrást egyáltalán nem tartalmazó táptalajra is kioltottuk a törzseket. A szaporodáshoz optimális 30 °C-os inkubálást 8 napon keresztül végeztem. (Egyes törzsek szaporodását folyadék tenyészetben is figyelemmel kísértem, lásd 4.3.15.)

4.3.12. Kromát-rezisztencia vizsgálata

A kromát minimális gátló koncentrációjának (M.I.C.-érték) meghatározása alapján 3-féle kromát-koncentrációt állítottunk be YEPD táptalajon ($2,5 \times 10^{-3}$ M; 3×10^{-3} M; $3,5 \times 10^{-3}$ M). Vizsgáltuk a törzsek növekedését, 10^7 sejt/ml koncentrációjú szuszpenzióból csíkot húzva az agar felületén (30 °C-on inkubálva).

4.3.13. Ivaros hibridizáció

A törzseket 3 napig 30 °C-on YED táptalajon növesztettük, majd sűrű sejtszuszpenziókat készítve (kb. 10^9 sejt/ml) SPA táptalajon páronként kereszteztük az ellentétes mating típusú és egymást komplementáló auxotrófia mutációkat hordozó törzseket. Páronként 15-15 μ l szuszpenziót kevertünk össze kacsasal az SPA táptalaj felületén kb. 1 cm átmérőjű foltban és 30 °C-on 3 napig inkubáltuk. Ezután az SPA-n keresztezett törzseket replikáztuk különböző minimál táptalajokra és néztük a keresztezésből származó utódsejtek növekedését. A keresztezésre felhasznált szelenát-rezisztens szülői törzseket külön-külön is kivittük az SPA felületére, majd át is replikáztuk a minimál táptalajokra kontrollként.

A Se^R -mutánsok keresztezésekor a következő minimál táptalajokat használtam replikázáshoz:

- (1) Kénforrásként ciszteint is tartalmazó MM táptalaj annak tesztelésére, hogy az auxotrófia mutációk komplementációja alapján a konjugáció egyáltalán lejátszódott-e. (Kontroll 1.)
- (2) Kénforrásként csak szulfátot tartalmaz MM táptalaj, amelyen vizsgáljuk, hogy a szulfát hasznosítás szempontjából is komplementálódtak-e, esetleg különböző komplementációs csoportokba oszthatók-e az Se^R -mutánsok.
- (3) Az auxotróf mutánsoknak megfelelő aminosavkiegészítéssel ellátott MM táptalaj. Ez kontrollként szolgál az auxotróf szülők back-mutációjának (szelenát-rezisztencia szempontjából) ellenőrzésére.

4.3.14. Protoplaszt fúzió és random spóraanalízis

Protoplaszt fúzió

A sejtek előtenyésztését YEPD táplevesben végeztük, kb. 5×10^5 sejt/ml koncentrációban leoltva. A sejtuszpenziót egy éjszakán keresztül 30°C-on 180 rpm-mel ráztuk, hogy a késői exponenciális növekedési fázist elérjük.

Protoplaszt készítéshez a sejtuszpenzióból centrifugálással (2500 g, 10 perc) kiülepítettünk kb. 5×10^8 sejtet. A sejteket először steril desztillált vízzel, majd 0,9 M szorbitollal mostuk. Mosás után a sejtekhez 10 ml, 1 mg/ml koncentrációjú protoplasztáló enzimdátot (Lysing enzyme) adtunk és 37 °C-on lassan ráztuk (80 rpm). Az enzimes kezelést közel 100%-os protoplaszt képződésig folytattuk. A protoplasztokat centrifugálással ülepítettük (1500 g, 10 perc), majd 0,9 M szorbitollal mostuk.

A protoplasztfúzióhoz a szülői törzsek protoplasztjait 1:1 arányban összekevertük (össztérfogat kb. 4 ml), majd lecentrifugáltuk (1500 g, 5 perc). A fúziót 0,6 ml PEG- Ca^{2+} oldattal indukáltuk. 30 perc múlva az eredeti és a tízszeresre hígított protoplaszt szuszpenziót ozmotikusan stabilizált fedőagarba (OMM) kevertük, majd OMM táptalajra rétegeztük. A szülői törzsek protoplasztjait is megfelelő mértékben hígítottuk és az előző módszerrel kiegészített OMM táptalajra vittük ki, hogy megállapítsuk a protoplasztok regenerációs képességét. A back mutáció meghatározása céljából a szülői protoplasztokat külön-külön OMM táptalajra vittük ki. A kiszélesztett mintákat 30 °C-on inkubáltuk.

Néhány nap múlva a kinőtt fúziós telepeket izoláltuk.

Random spóraanalízis

A protoplaszt fúzióból származó hibridek közül a jól spórázó tenyészeteket kiválasztottam, ezekből MM táptalajon szélesztettem, majd innen a különálló telepeket izoláltam és YED táptalajra leoltottam. Amikor már jól spóráztak (kb. 3 nap múlva) Lyticase enzimdattal emésztettük az aszkuszfalakat. A kezelést 1 ml 1,5 mg/ml koncentrációjú enzimdátban két kacsnyi sejttel, 37 °C-on, 1 éjjelen át végeztük. (A sejttel a vegetatív sejtekről is leoldódik, de mivel az enzimdát vizes alapú, a kiegyenlítetlen ozmotikus nyomás miatt a vegetatív sejtek lizálnak.)

A spórákat Bürker kamrás számolást és spóraszám beállítást követően YEPD felületére szélesztettem 9 párhuzamosban (100, 500 és 1000 spóraszámmal).

A kinőtt telepek száma (a túlélés százaléka) a spórák életképességére utal, a különálló telepek megfelelő táplemezekre replikázásával pedig a vizsgált tulajdonságok öröklődésére, a rekombinációra következtethetünk. Vizsgálatomban kénforrásként kizárólag szulfátot vagy

ciszteint tartalmazó MM-S⁻ tápagarra (a szülői törzsek adenin és arginin auxotrófiájának megfelelő aminosav kiegészítésekkel ellátva vagy anélkül) és 0,4 mM Na-szelenátot tartalmazó YEPD tápagarra replikáztunk. A különböző táplemezekeken megjelenő telepszámokat számoltuk és hasonlítottuk össze.

4.3.15. Kénforrás-hasznosítás vizsgálata

Vad (Se^S) és szelenát rezisztens mutáns (Se^R) törzsek növekedését vizsgáltuk különböző kénforrásokon. MM-S⁻ táptalajhoz az auxotróf törzsek számára 0,005%-ban a megfelelő aminosav kiegészítést adtunk, illetve kénforrásként a következőket alkalmaztuk:

- szervetlen kénforrásként 250 µg/ml:
szulfát ((NH₄)₂SO₄), szulfit (Na₂SO₃), tioszulfát (Na₂S₂O₃)
- szerves kénforrásként 100 µg/ml:
glutation, cisztein, metionin

A kontroll semmiféle kénforrást nem tartalmaz (MM-S⁻ tápközeg). (A kénvegyületeket több koncentrációban is kipróbáltuk, de a dolgozatban közölt eredmények ilyen koncentrációk beállításával készültek).

Tenyéskörülmények: kezdeti sejtkoncentráció (beoltáskor) 5×10⁵ sejt/ml; tápleves pH-ja pH=5,5; az inkubáció kémcsőben, rázatva, 28 °C-on, 3 x 3 párhuzamosban 3 napon keresztül történt.

Szaporodási görbék felvétele: a szaporodó tenyészetek nyomonkövetését a sejtszuszpenziók optikai denzitásának mérésével (λ = 650 nm-en) végeztük meghatározott idő-intervallumokban.

4.3.16. Szelén bioakkumuláció mérése

A sejtek által akkumulált szelén mennyiségét Tiran és mtsi (1993) módszere alapján, a szelén Se(IV) formájának meghatározásával mértük. A vad (szelenát szenzitív) és mutáns (szelenát rezisztens) törzsek sejtszuszpenziójához Se(VI)-ot adagoltunk Na₂SeO₄ formában 0,04-4 mM koncentráció tartományban a fermentáció kezdetén. A megfelelő mintákhoz kénforrásként 0,04 M KHSO₄-ot alkalmaztunk. 12 óra elteltével a szuszpenziókból 8-8 ml mintát vettünk, majd ezeket centrifugáltunk (4000 rpm, 5 perc). A kiülepített sejteket háromszor mostuk 0,015 M foszfát pufferben, hogy a nem- vagy gyengén kötött szelént a sejtek felszínéről eltávolítsuk, majd az eqvivalens mintákat teflon mintatartókba helyeztük, amelyben az emésztést és a redukciót végeztük. Az emésztéshez 115 °C-on cc. kénsavat,

hidrogén peroxidot és H_2SO_4 -ban oldott V_2O_5 -oldatot, a redukcióhoz pedig tömény sósavat használtunk a leírás szerint (Tiran et al., 1993). Hűtés után a mintákat oldottuk és a szelén tartalmat hidridgenerációs atomfluoreszcens spektrometriával határozták meg (HG-AFS). A mért koncentrációértékekből a teljes Se bioakkumulációt számoltuk száraz biomasszára vonatkoztatva.

4.3.17. Élesztősejtek szulfát-felvételének izotópos mérése

YEPD táptalajban 30°C -on 15 órán keresztül inkubálva (rázatott tenyészet: 180 rpm) szaporítottuk a sejteket, majd kiülepítettük és minimál táptalajban a megfelelő tápanyagokkal kiegészítve újabb 12 órán keresztül inkubáltuk. Kicentrifugáltuk a sejteket, kétszer mostuk, majd szulfát-mentes minimál táptalajban 1,5 órán keresztül éhezettük tovább.

Ezután tettük az izotóp szulfátot a mintákhoz és kezdtük meg a szintillációs méréseket: 10 ml (4×10^7 sejt/ml) szuszpenzióhoz 10 μl $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ -ot (287 MBq/ml; Izotóp Intézet, Budapest) mértünk. Meghatározott időintervallumok szerint 3 párhuzamosból 1-1 ml mintát vettünk ki, amit 9-9 ml 10 mM nem radioaktív Na_2SO_4 -oldatba mértük és 10 percre inkubáltuk. Ezután kiszűrtük a sejteket nitrocellulóz membránon (pórusátmérő 0,45 μm , Sartorius), majd átmostuk 10 ml desztillált vízzel, végül a membránokat egy szcintillációs koktélt tartalmazó mintatartóba helyeztük és az egyes minták radioaktivitását mértük szcintillációs készülékkel (Tri-Carb 1600 TR, Packard, USA).

Élesztősejtek inaktiválása mertiolátos kezeléssel

Egy fungisztatikus vegyszert, a 2-(ethyl-mercury-thio)-nátrium-benzoátot (kereskedelmi nevei: mertiolát vagy tiomerzál) alkalmaztuk az élesztősejtek metabolikus gátlására (Deighton et al., 1979). A mertiolátot az egyes mintákhoz 50 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban, 10 perccel a radioaktív szulfát bemérése előtt tettük.

4.3.18. Kénhidrogén-termelés vizsgálata

Ólom-acetátos szűrőpapírcsíkok feketedésének vizsgálata

A megfelelő tenyészeteket (vad típusú és szelenát-rezisztens törzsek) Erlenmeyer lombikban ráztuk 30°C -on. A lombikok szájához befelé, a fermentációs gőztérbe ólom-acetáttal átitatott steril papírcsíkokat lógattunk. A H_2S -termelést az ólom-acetátos papírcsíkok feketedésének mértékével vizsgáltuk vizuálisan.

H₂S-termelés vizsgálata fotometriás módszerrel

A kénhidrogén termelés mennyiségi meghatározásához Jiranek és mtsi (1995) módszerét alkalmaztuk kisebb változtatásokkal, optimalizálva. A kimutatás elve, hogy a tápközegből felszabaduló H₂S-t egy kadmium-hidroxidot tartalmazó csapdába vezetjük, ahol a kénhidrogén és a kadmium-hidroxid reakciójából kadmium-szulfid keletkezik. A kadmium-szulfidot a savas amin-reagenssel (lásd 42. oldal) színreakcióba visszük, amelyben leukometilénkék képződik, ami a Fe(III) ionok jelenlétében metilénkékké oxidálódik. A kék színű oldat extinkciójából következtetünk az elnyelt kénhidrogén mennyiségére.

Mivel a kéntartalmú vegyületek fényérzékenyek, a fermentációs lombikot alufóliával befedtük, vagy sötét helyen (termosztát szekrényben) végeztük a fermentációt. A kimutatás során is a különböző mintatartókat, amelyekbe a kén-hidrogént elnyeltük illetve színreakcióba vittük, alufóliával a fénytől elzártuk. A tenyésztés után a fermentlevet tartalmazó lombikot gumicső segítségével 10 ml kadmium-hidroxid oldatot tartalmazó kénhidrogén csapdával kötöttük össze, majd egy másik cső segítségével inert nitrogént vezettünk a fermentleven keresztül, hogy kiűzzük az elnyelt kén-hidrogént. A kén-hidrogénből kadmium-hidroxiddal reakcióba lépve kadmium-szulfid keletkezik. A levegőztetés után 325 µl amin-reagenst adunk a kadmium-hidroxid oldathoz, és a mintát 1 percig erősen összerázzuk. Ezután fél óráig állni hagyjuk, majd az oldat abszorbanciáját 630 nm-en mértük. A termelt kénhidrogén mennyiségét egy előre megszerkesztett kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg.

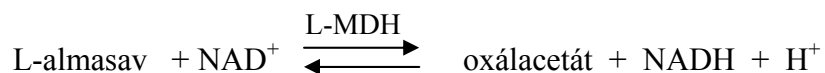
Fermentációs paraméterek a kén-hidrogén mérési kísérletekben:

A YEPD táplevesben beállított kísérletek esetében 200 ml térfogatban oltottam le és a 2. nap elteltével végeztem a méréseket. A mustban végzett fermentációnál 600 ml térfogatban 14 napon keresztül folytattuk a fermentációt (a sterilre szűrt must refrakciója 18,4 volt, mely a fermentáció végén 6,5-re csökkent). Borban 200 ml térfogatban az 5. nap elteltével állítottuk le a fermentációt. A kiindulási sejtkoncentráció minden esetben 10⁶ sejt/ml volt, a fermentációt 25°C-on végeztük.

4.3.19. Almasavtartalom meghatározása enzimes UV-tesztel (Boehringer Mannheim teszt)

Az almasav teszt kémiai elve:

Az L-almasav NAD koenzim segítségével az L-malát-dehidrogenáz (L-MDH) jelenlétében oxálacetáttá oxidálódik:



A reakció egyensúlya az L-almasav képződés felé tolódik el, azonban az oxálacetát lekötése a rendszerből az egyensúly oxálacetát és NADH felé való eltolódását okozza. Ez utóbbi reakciót L-glutamát jelenlétében a glutamát-oxálacetát-transzamináz (GOT) enzim katalizálja.



Az első reakcióban képződött NADH mennyisége ekvivalens (sztöchiometrikus) az L-almasav mennyiségével. A NADH mennyiségét 334, 340 vagy 365 nm-en mért abszorbancia alapján számítjuk ki a gyártó által megadott összefüggés segítségével.

4.3.20. Aromaprofil vizsgálat GC-MS technikával

Aromavegyületek kinyerése

15-15 ml mintát egy-egy 40 ml-es, csavaros kupakos, szeptumos üvegedénybe mértünk be, melyet alumínium blokktermosztátban kevertetés mellett minimum 2 óra hosszát ekvilibráltunk. Vizsgáltuk a mintahőmérséklet, a kevertetés, az adszorpciós és deszorpciós idő hatását a kinyert illóanyagok mennyiségére. Legmegfelelőbbnek a 40 °C termosztát-hőmérséklet, 10 perc adszorpciós idő, 2 perces deszorpció mutatkozott.

Az előkísérletek alapján választott szál 100 µm metil-szilikon borítású (PDMS) volt. A PDMS szálát közvetlenül a gőztérbe helyezés előtt 10 percig az injektor-hőmérsékleten deszorbeáltattuk a labor levegőben megkötött szennyezések eltávolítása céljából.

Mintánként 3 SPME (szilárd fázisú mikroextrakciós) mintavétel történt.

Az SPME mintavétel sémája a 6. ábrán látható.

Aromavegyületek szétválasztása

A kromatográfiás körülmények a következők voltak:

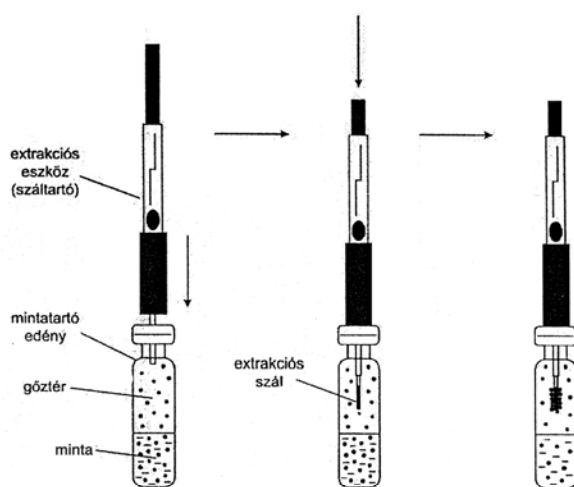
az alkalmazott készülék HP 5890 gázkromatográfhoz csatlakozó HP 5971 tömegszelektív detektor.

Az alkalmazott oszlop: RH-5 ms+ oszlop 30 m hosszú, 0,25 mm belső átmérővel, 0,25 μm filmvastagsággal, a vivőgáz hélium volt. Az alkalmazott hőmérséklet program: 60°C 1 perc, 10°C/perc 100°C, 15°C/perc - 200°C, 8 perc a véghőmérsékleten, splitless injektálás, detektor 260 °C.

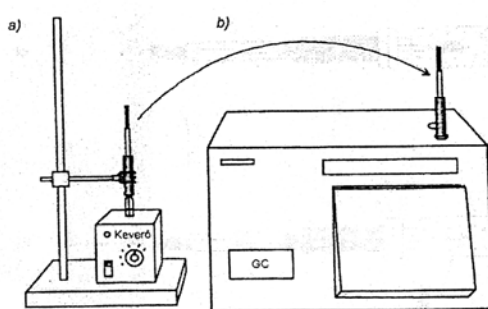
A vegyületek azonosítása számítógépes könyvtárkereséssel történt, a Wiley 275 könyvtár felhasználásával.

Kiértékelés

Mivel belső standardot nem használtunk, a kiértékelésnél az abszolút csúcsterületeket hasonlítottuk össze. (A táblázatokban az egyszerűség kedvéért az abszolút értékek százezred részét tüntettük fel.)



SPME adszorpció

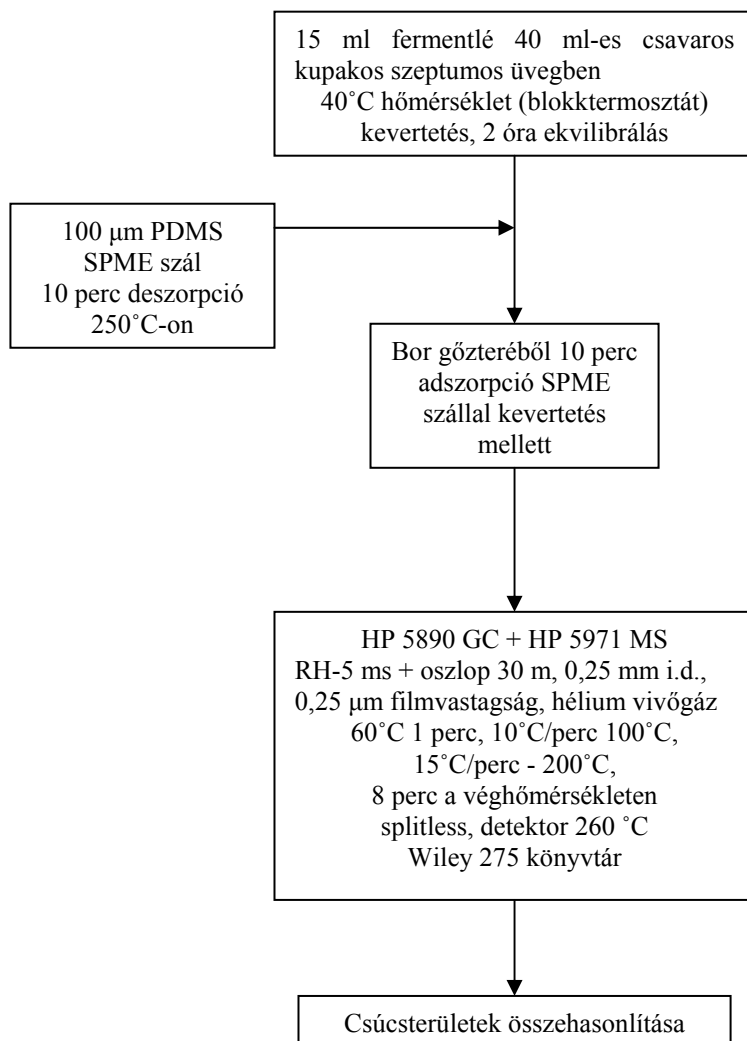


SPME deszorpció

Szilárd fázisú mikroextrakció (SPME)

6. ábra Az SPME mintavétel sémája

A GC-MS vizsgálat blokksémája a 7. ábrán látható.



7. ábra A GC-MS vizsgálat blokksémája

4.3.21. Statisztikai módszerek vizsgálati eredmények kiértékelésére

A dolgozatban az alábbi módszereket alkalmaztam vizsgálati eredményeim statisztikai elemzésére.

t-próba

A t-próbák vagy Student-féle t-próbák egy vagy két normális eloszlású változó átlagát vizsgálják. Ha a mintákban szereplő adatok valamilyen szempont szerint párba állíthatók (például két mérést végzünk ugyanazon a mintán, vagy páros mintákon végzünk megfigyeléseket), a kapott minták összefüggők, összetartozó páros minták lesznek. A páros t-próba két összetartozó minta vagy illesztett párok esetén az átlagos változást az adat-párok különbségein (ritkábban hányadosán) elvégzett egymintás t-próbával teszteli.

A t-próbákat Windows Excell szoftverrel végeztem.

Főkomponens analízis

Többváltozós statisztikai módszer, egymással többnyire bonyolult összefüggésben álló tényezők rendszerszemléletű vizsgálatára és leírására, amelyben a megfigyelési változók n dimenziós teréből a faktorok $k \ll n$ dimenziós terébe történő áttérés valósítható meg. Ennek az a jelentősége, hogy a megfigyelési egységek az eredeti n számú koordináta helyett általában jóval kevesebb k számú koordinátával jelentős információvesztés nélkül leírhatók, sőt szerencsés esetben két dimenzióra redukálva a síkban ábrázolhatók. Ez pedig lehetővé teszi a megfigyelések esetleges elkülönülő csoportjainak felismerését.

A főkomponens analízishez a MINITAB szoftver programot használtam.

Klaszteranalízis

Annak a vizsgálatára használható, hogy a megfigyelések ill. a változók milyen csoportokba (osztályokba) sorolhatók bármiféle ezzel kapcsolatos előzetes feltételezés nélkül. Meghatározott hasonlósági szint beállítása esetén kimutatható és ábrázolható, hogy mely megfigyelési egységek hasonlítanak egymásra nagyszámú adott jellemzőjük alapján (megfigyelési változók) a rögzített szintnél nagyobb mértékben.

Klaszteranalízist a "molekuláris ujjlenyomatok" elemzésénél használtam a Molecular Analyst Fingerprint 2.0 szoftver segítségével.

5. Kísérleti eredmények

5.1. *Schizosaccharomyces* genus-hoz tartozó törzsek molekuláris vizsgálata

Egy korábbi törzs-szűrési vizsgálat során, amikor 18 *Schizosaccharomyces pombe* és 3 *Schizosaccharomyces octosporus* törzs almasav-bontását, szaporodását, etanol toleranciáját illetve H₂S-termelését vizsgálták, nagymértékben eltérő jellemzőket határoztak meg a fajok belül is és különböző fenotípuscsoportokba sorolták a vizsgált törzseket (Geleta, 1996).

Ugyanezen törzsek molekuláris genotípus-analízisét végezve azt kerestem, hogy a különböző fenotípusos tulajdonságokkal rendelkező törzsek RAPD mintázata mutat-e eltéréseket, mennyire hasonlóak a törzsek, illetve a genotípusos vizsgálat eredményei és az ott kimutatható törzsek közötti hasonlóságok / különbségek mennyiben korrelálnak a fenotípusos tulajdonságokkal.

A törzsek ribotípus analízise során vizsgáltam a genuszon belül fennálló különbségeket, a három *Schizosaccharomyces* faj identifikálásának lehetőségét ezzel a módszerrel, a fajok közötti hasonlóságot és az alfajok (pl. *Schiz. pombe* var. *pombe* és var. *malidevorans*) elkülöníthetőségét.

5.1.1. RAPD-PCR analízis

18 *Schizosaccharomyces pombe* és 3 *Schizosaccharomyces octosporus* törzsből sikeresen izoláltam genomiális DNS-t a 4.3.1. alatti módszerrel. RAPD eljárást optimalizáltam ezen *Schizosaccharomyces* törzsekre, négyféle random primert (4.3.2. szerint) alkalmaztam a fajok belüli és fajok közötti különbségek kimutatására. A reprodukálható "ujjlenyomatokat" elemeztem és a 8. ábrán látható dendogramot szerkesztettem.

A RAPD-PCR vizsgálat során öt egymástól határozottan elkülönülő csoportot kaptam klaszter analízissel (A - E). A többi klaszterrel csupán mintegy 30%-os hasonlóságot mutató C csoportba két *Schiz. octosporus* törzs (SZMC 702, SZMC 703) tartozik. Az A- és B csoportba sorolhatók két kivétellel a *Schiz. pombe* törzsek, amelyek között viszonylag nagy a hasonlóság, de nem azonos a RAPD ujjlenyomatuk, még a két nagyobb csoporton belül is vannak csupán 78-85%-ban hasonló törzsek. Az A- és B klaszter között kb. 76%-os a hasonlósági szint.

Érdekes módon két *Schiz. pombe* törzs (N 132 és LBG 1145) RAPD mintázata nagymértékben eltért az összes többitől. A *Schiz. octosporus*-ként nyilvántartott SZMC 413

törzs RAPD-mintázata nagyon eltért a másik két *Schiz. octosporus* törzsetől, a B csoportba került és 96%-os hasonlóságot mutatott a RIVE 4-4-3 *Schiz. pombe* törzsszel, valamint több mint 90%-ban hasonló további 3 másik *Schiz. pombe* törzsszel. A törzs fenotípusos tulajdonságai is nagymértékben eltértek a faj másik két képviselőjétől, ezért feltételeztem, hogy a törzs rosszul lett identifikálva. Később a ribotípusos és mikroszkópos vizsgálataink is megerősítették, hogy az SZMC 413 törzs a *Schiz. pombe* fajba tartozik.

A RAPD mintázat alapján a kénezett mustból izolált három *Schiz. pombe* törzs (B 573, B 578, B 579) teljesen azonosnak tűnt, és fenotípusos tulajdonságaik is nagyon hasonlóak voltak. Azonos származási helyüket tekintve, illetve RAPD mintázatuk azonossága és fenotípusos tulajdonságaik nagymértékű hasonlósága alapján ezeket izogenikusnak feltételezzük.

A *Schiz. pombe* fajon belül korábban felállított varietások (*var. pombe* és *var. malidevorans*) nem különültek el a klaszter-analízis során.

4. táblázat *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* törzsek élettani tulajdonságai

RAPD csoportok	Törzsek	Almasav-bontás	Szaporodás	H ₂ S-termelés
RAPD A	RIVE 4-2-1	+	+++	++
	RIVE 4-4-2	+	+++	++
	RIVE 4-6-1	++	+++	++
	C 44-6-1	++	+++	+++
	RIVE 4-5-1	+	+++	+++
	C 44-1-1	++	+++	+++
	S 142	+	+++	++
RAPD B	RIVE 4-4-3	+++	++	++
	S 413	++	+++	+++
	NY 315	+++	+++	+++
	L.972	+++	+++	++
	L.975	+++	+++	++
	B 573	+++	+++	+
	B 578	+++	+++	+
	B 579	+++	+++	(+)
	RIVE 4-1-1	++	+++	+++
	C 44-1-3	++	+++	+++
RAPD D	N 132	+	+++	+++
RAPD E	LBG 1145	+	+++	+++
RAPD C	S 702	+	+	+++
	S 703	+	+	+++

A korábban vizsgált élettani jellemzők az 1. sz. mellékletben találhatóak. A 4. táblázatban a RAPD csoportok és a törzsek fenotípusos tulajdonságainak összefüggéseit vizsgáltam. Ezen tulajdonságok és a RAPD ujjlenyomat alapján felállított klaszterek között az alábbi összefüggéseket figyeltem meg:

Törzsek almasav-bontó képessége és a RAPD ujjlenyomatok összefüggése

Az erős almasav-bontó törzsek - amelyek már a fermentáció első két napja alatt, a stationner szaporodási fázisban, az almasavtartalom legalább 50%-át lebontották, de a 7. napra mindenképpen 90% feletti almasavbontást produkáltak, kivétel nélkül a RAPD-B csoportba tartoznak, és ezen csoporton belül is 89%-os hasonlóságot mutatnak. A leggyengébb almasav-bontó izolátumok – ezek az első két nap alatt az almasavtartalom kevesebb mint 20%-át metabolizálták, de a 7. napra is 50% alatti almasavbontást mutattak, sőt legtöbbjük 20 % alatt - egyike se került ebbe a B csoportba: ezek a *Schiz. pombe*-k közül az A csoportba esnek, illetve az elkülönülő két *Schiz. pombe* (RAPD-D és RAPD-E) almasav-bontása is gyenge, továbbá a *Schiz. octosporus*-oké (RAPD-C) is. Elkülöníthető egy "közepes" almasavbontó aktivitással rendelkező csoport is: ezek a fermentáció 2. napjára az almasav 20-50%-át bontották le, a 7. napra 60-90% közötti almasavbontást tapasztaltunk. Ennek reprezentánsai RAPD mintázatuk alapján az A és B csoportba is esnek.

Szaporodás illetve etanol tolerancia és a RAPD mintázatok közötti korreláció

A szaporodást az 540 nm-en mért OD-értékek alapján vizsgálták, szintén a 2. és 7. napon értékelve, pH = 3,5- és pH = 6,0-jú YEPD táplevesekben 25°C-on inkubálva.

A RAPD mintázatban is nagyon elkülönülő csoportot alkotó (C-csoport), az SZMC 702 és SZMC 703 *Schiz. octosporus* törzsek nagyon gyengén szaporodtak, generációs idejük igen magas volt. További vizsgálatok során az etanol toleranciára végzett screenelés eredményeképpen is ezek a *Schiz. octosporus* törzsek különültek el legmesszebb a többi törzstől: 5%-os etanol koncentrációnál pH = 3,5-jú tápközegben a 18 vizsgálatba vont törzs közül ezek generációs ideje volt kiugróan a legnagyobb. RAPD "ujjlenyomatuk" alapján ezek csak 30%-os hasonlóságot mutattak a többi vizsgált törzssel.

Egyéb jellegzetességet nem találtunk a RAPD mintázat, illetve ezen fenotípusos tulajdonság között.

Kén-hidrogén termelés

A különböző törzsek RAPD-mintázatai és a kén-hidrogén termelési képességük között nem találtunk karakterisztikus összefüggést. A kén-hidrogén termelés viszonylag erős skálán való ingadozást mutat. A leggyengébb kén-hidrogén termelő törzsek RAPD "ujjlenyomatuk" alaján a B csoporton belül egy elkülönülő clustert alkottak (B 573, B 578, illetve a B 579 törzsek) és mintázatuk teljesen megegyezett. Mivel a H₂S-termelés mérésére egy szemikvantitativ módszert (4.3.18.) alkalmaztak, ami reprodukálható és összehasonlítható eredményeket adott ugyan, de a mennyiségi meghatározásra szempontjából pontatlan, így bár a három törzs ezen mérési eljárással némi különbséget mutatott a kén-hidrogén termelésben, de mindhárom relatív gyenge kén-hidrogén termelő törzsnek bizonyult, így gyakorlatilag azonos törzseknek tekinthetjük ezeket.

A vizsgált törzsek 3 élettani tulajdonságának mérési eredményei alapján főkomponens analízist (PCA – Principal Component Analysis) végeztem (9. ábra). A főkomponens analízissel az összes vizsgált tulajdonságot figyelembe véve, azok kombinációjával képezzünk hasonlósági csoportokat. A PCA a sokféle változóból (vizsgált tulajdonságból) kétdimenziós rendszert képez, amelyben az egymáshoz közel eső mintákat hasonlónak tartja.

A törzsek fenotípusos tulajdonságainak főkomponens analízise és a RAPD-PCR klaszteranalízis eredményeinek összefüggéseit kerestem. A kérdés az volt, hogy a fenotípus analízissel (PCA) illetve a genotípus analízissel (RAPD-PCR klaszteranalízis) felállított hasonlósági csoportok korrelálnak-e egymással. A 9. ábrán a RAPD csoportoknak megfelelő színezéssel emeltem ki a törzseket jelző pontokat a koordináta rendszerben.

A nagyon gyenge almasavbontással és nagy generációs idővel jellemzett *Schiz. octosporus* törzsek (S 702 és S 703) a PCA analízissel is egészen elkülönültek a többi törzstől. A gyenge kén-hidrogén termelő és egyben legjobb almasavbontó törzsek (B 573, B 578, B 579 és L. 975) szintén egy elég jellegzetesen különálló csoportot képeznek. Kicsit távolabb esik a másik három törzstől a B 579, amelyre jellemző volt, hogy az összes törzs közül a legkisebb mértékben termelt kén-hidrogént. A borászati szempontból fontos élettani tulajdonságok legjobb kombinációjával rendelkező törzsek (rövid generációs idő, jó almasavbontó aktivitás, kevés H₂S termelés) a koordináta rendszer jobb felső régiójába esnek.

A koordináta rendszer középső részén számos további, a RAPD A- és B-csoportba tartozó törzs található. Ezek vagy gyengébb almasavbontó aktivitással rendelkeznek, vagy erősebb kén-hidrogén termelők, emiatt már kevésbé előnyösek borászati szempontból. A RAPD-B

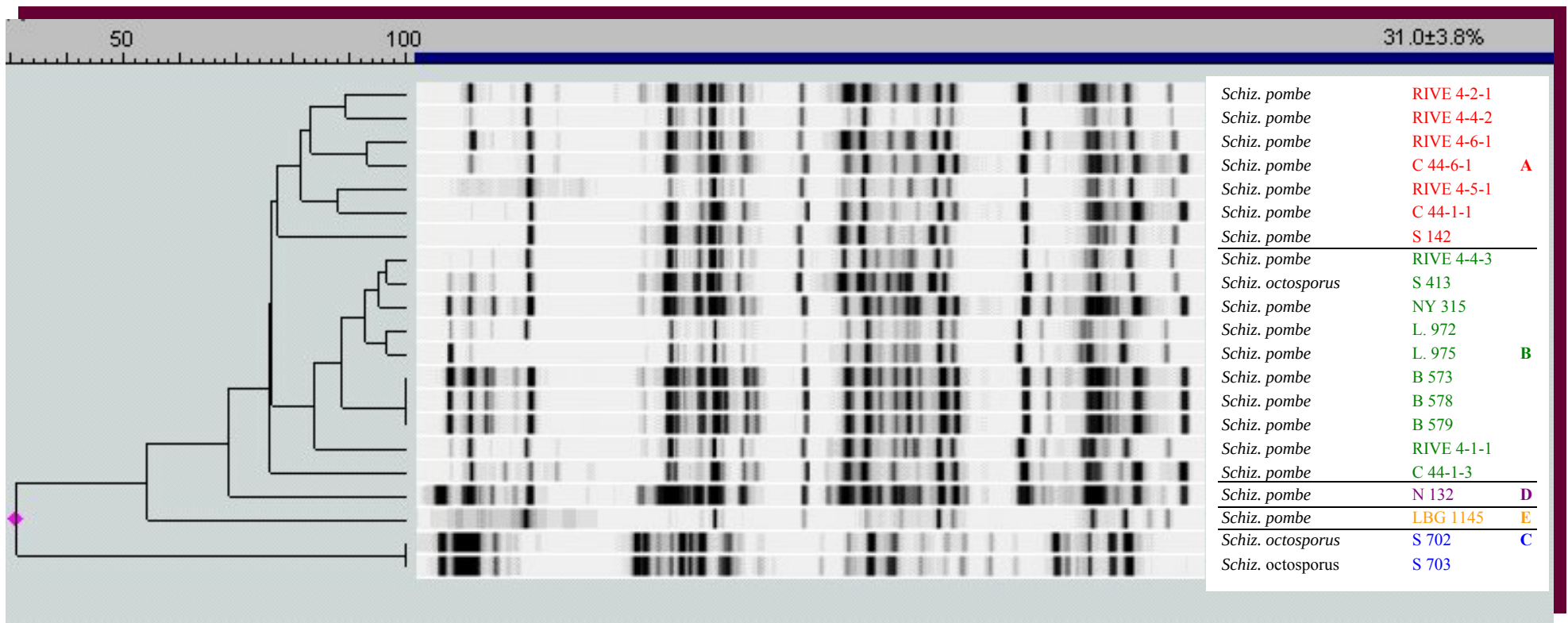
csoportból az R 411 törzs már igen távol esik a többi, ugyanezen RAPD klaszterbe tartozó törzstől és ezen a példán jól látszik, hogy a RAPD analízisben kimutatott genomszintű hasonlóságok és a fiziológiai tulajdonságok hasonlósága nem mindig hozhatók "szinkronba".

A PCA- és RAPD csoportok között bizonyos korreláció található, de nem minden esetben egyértelmű tehát az "átfedés". Még az izogenikus törzsek, mint az L. 975 és L. 972 is távolabb esnek egymástól, mint az L. 975 törzs a vizsgált fenotípusos tulajdonságok alapján a B 573 és B 578 törzsektől. A RAPD-PCR analízissel kimutatható nagyfokú genomszintű hasonlóság ellenére is lehetnek a törzsek fiziológiai tulajdonságaiban ilyen eltérések.

A RAPD-A csoport tagjai viszonylag nagy szórással, de a koordináta rendszer középső részébe kerültek, egy kivétellel a vízszintes koordinátától (második komponens) negatív irányba.

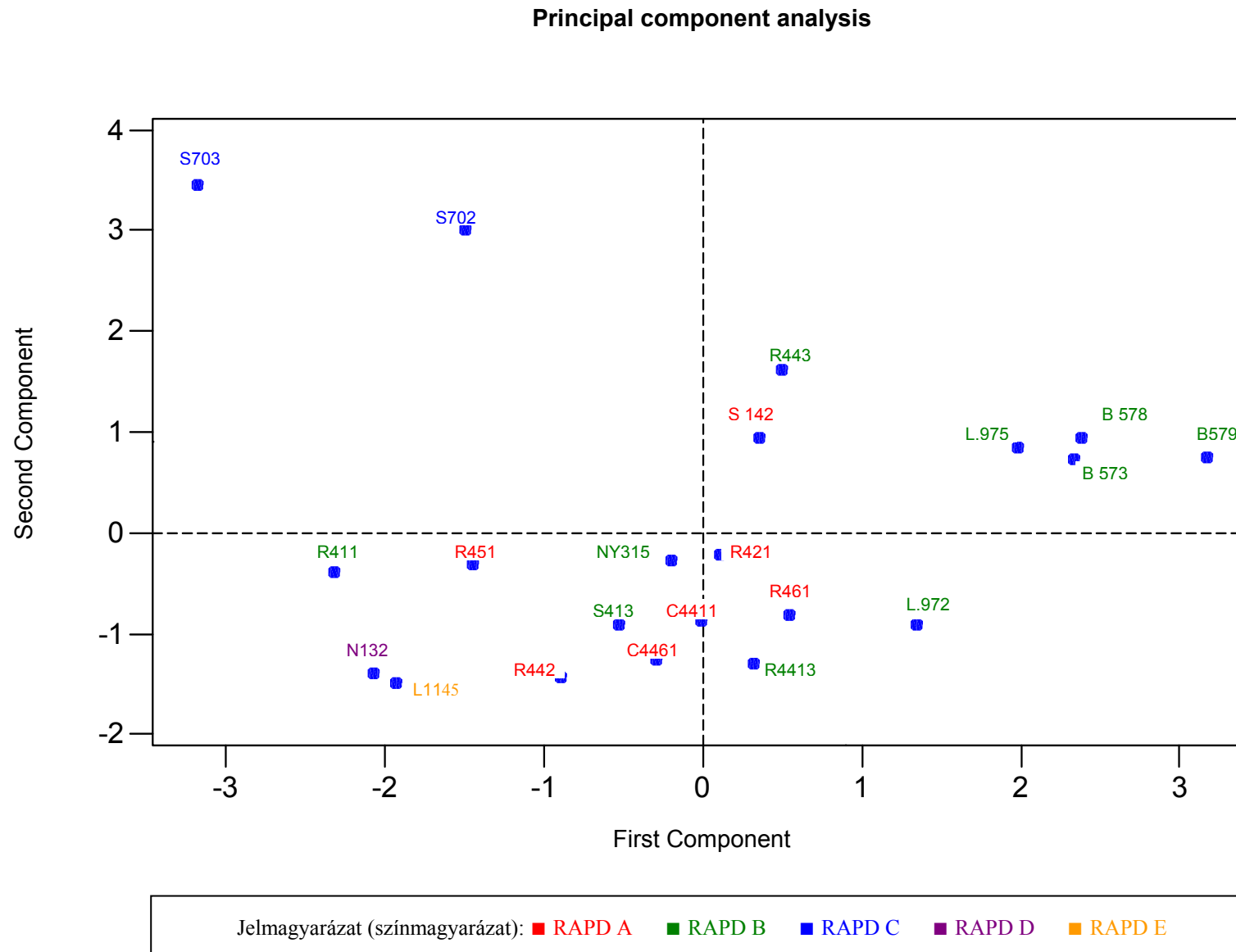
Az N 132 és L 1145 törzsek RAPD hasonlósági szintje nagyon alacsony volt a többi törzshöz viszonyítva, de egymáshoz is csupán kb. 55%-ban hasonlítanak. Ennek ellenére a PCA alapján igen közel esnek egymáshoz.

Úgy tűnik tehát, hogy olyan csoportok között, amelyek nagyon nagymértékű különbségeket mutatnak a fenotípusos tulajdonságokban és a főkomponens analízissel is messze elkülönülnek, azok a RAPD klaszteranalízissel is távolabbi csoportba kerültek. Azonban a hasonló genotípusú törzsek között mégis nagy szórás lehet a fenotípusos jellemzőket tekintve. A RAPD analízis nagyobb valószínűséggel mutathatja azonban a genomszintű különbségek alapján előre, hogy a nem vizsgált fenotípusos tulajdonságok mennyire fognak hasonlítani.



random primerek "annealing" hőmérséklet	OPE – 02 37 °C	50 % GC 36 °C	70 % GC 38 °C	80 % GC 42 °C
--	-------------------	------------------	------------------	------------------

8. ábra RAPD – PCR alapján szerkesztett dendrogram



9. ábra *Schizosaccharomyces pombe* és *octosporus* törzsek főkomponens analízise

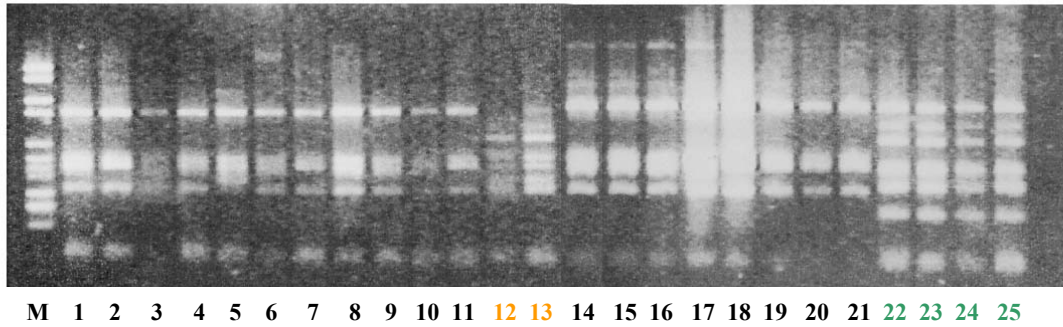
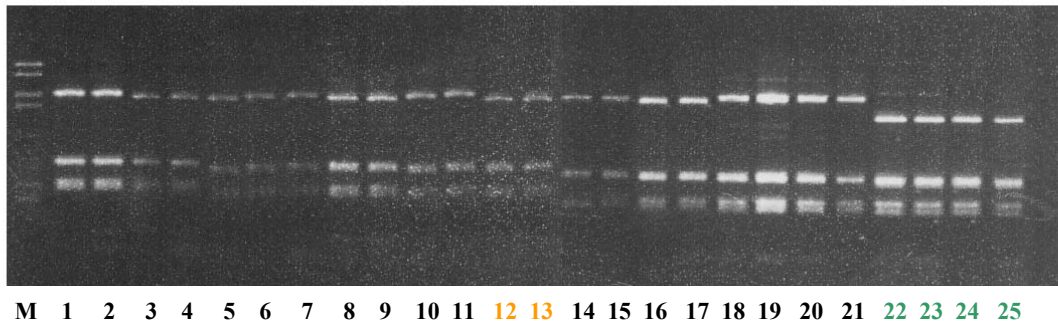
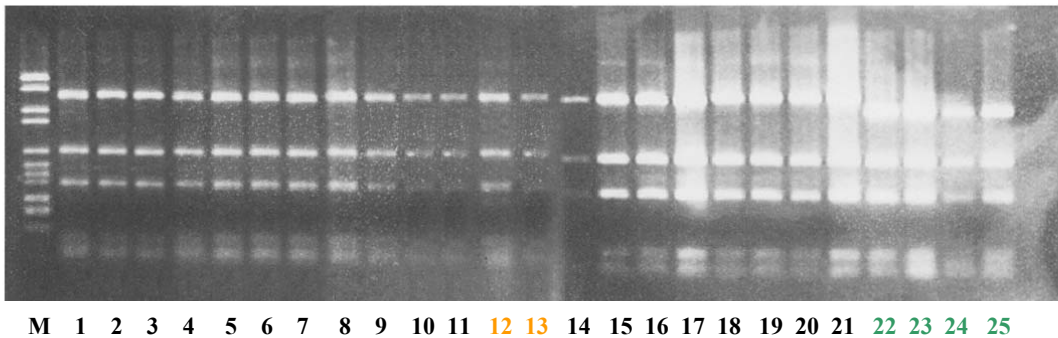
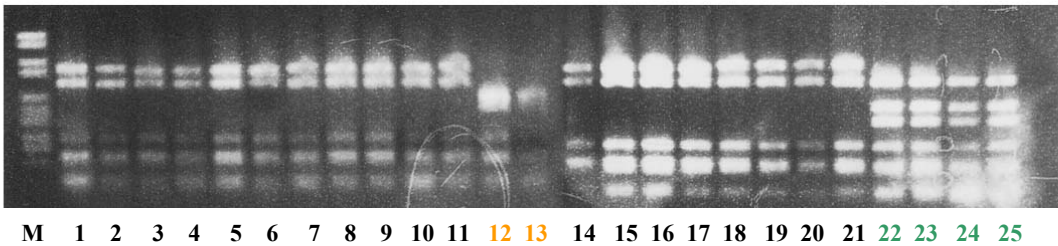
5.1.2. Ribotipizálás

A genomiális DNS alapján az NS1 és ITS4 primer párok segítségével egy körülbelül 2,5 kbp méretű fragmentet amplifikáltam a riboszomális DNS régióból. A ribotípus vizsgálatba a RAPD-PCR analízissel jellemzett *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* törzseken kívül a *Schiz.* genuszba tartozó harmadik faj, a *Schiz. japonicus* törzseit is bevontuk.

Az alkalmazott restrikciós endonukleázok közül az *ScrFI* és *MspI* enzimek hasításával kapott mintázat csak a *Schiz. japonicus* törzsek esetében különbözött, a *pombe* és *octosporus* törzsek azonos mintázatot adtak, azonban a *HaeIII* és *Sau3AI* enzimek hasítása által nyert "ujjlenyomat" mindhárom fajt elkülönítette a genuszon belül. A két utóbb említett enzim segítségével, vagy a négy enzim által nyert mintázat kombinációja alapján a három faj egymástól megkülönböztethető. A 10. ábrán látható géleképeken jól látszanak a fajok eltérő restrikciós mintázatai, amelyekkel a nemzetség jelenleg elfogadott három faja identifikálható. Fajon belül a ribotípus vizsgálat semmiféle különbséget nem mutatott, a korábban nyilvántartott változatok (alfajok) nem különültek el.

A *Schiz. pombe* és az *Schiz. octosporus* ujjlenyomata nagyobb hasonlóságot mutat, ami egy közelebbi rokonsági fokot jelenthet a két faj között, melyektől a harmadik faj – a *Schiz. japonicus* – távolabbi "rokonságban" van.

A vizsgálat során megerősítést nyert az a gyanú, hogy egy *Schiz. octosporus*-nak nyilvántartott törzs (SZMC 0413) rosszul volt meghatározva, az valójában a *pombe* fajhoz tartozik. Ribotípusa alapján is teljesen elkülönült a másik két *Schiz. octosporus*-tól (SZMC 0702, és SZMC 0703), és mintázata a *pombe* törzsekkel volt megegyező, ahogyan azt a RAPD-PCR analízis során is már észrevettük, sőt a törzs fenotípusos tulajdonságai is nagy mértékben különböztek a másik két *Schiz. octosporus* törzsétől.

Sau3AI**MspI****ScrFI****HaeIII**

M: molekulatömeg marker	1: <i>Schiz. pombe</i> L. 972	2: <i>Schiz. pombe</i> L. 975	3: <i>Schiz. pombe</i> LBG 1145
4: <i>Schiz. pombe</i> RIVE 4-1-1	5: <i>Schiz. pombe</i> RIVE 4-2-1	6: <i>Schiz. pombe</i> RIVE 4-4-2	7: <i>Schiz. pombe</i> RIVE 4-4-3
8: <i>Schiz. pombe</i> RIVE 4-5-1	9: <i>Schiz. pombe</i> RIVE 4-6-1	10: <i>Schiz. pombe</i> S 142	11: <i>Schiz. pombe</i> (!) S 413
12: <i>Schiz. octosporus</i> S 702	13: <i>Schiz. octosporus</i> S 703	14: <i>Schiz. pombe</i> C 44-1-1	15: <i>Schiz. pombe</i> C 44-1-3
16: <i>Schiz. pombe</i> C 44-6-1	17: <i>Schiz. pombe</i> N 132	18: <i>Schiz. pombe</i> NY 315	19: <i>Schiz. pombe</i> B 573
20: <i>Schiz. pombe</i> B 578	21: <i>Schiz. pombe</i> B 579	22: <i>Schiz. japonicus</i> SCHJ 1	23: <i>Schiz. japonicus</i> Y 976
24: <i>Schiz. japonicus</i> C 44-5-1	25: <i>Schiz. japonicus</i> C 44-3-1		

10. ábra *Schizosaccharomyces* nemzetséghez tartozó törzsek ribotipizálása

5.2. Kén-asszimilációban sérült *Schiz. pombe* mutánsok izolálása és vizsgálata

5.2.1. Szelenát-rezisztens mutánsok indukciója

Schizosaccharomyces pombe törzsek esetében szulfát-hasznosításban sérült mutánsok izolálását végeztem szelenát-rezisztens törzsek indukciójával. Ahogy az irodalmi összefoglalóban említettem, a szelenát a szulfát toxikus analógja, a sejtbe való bejutását a szulfát-permeáz segíti, ahol a szulfát-redukciós anyagcsereút enzimes folyamatai toxikus szelenitté redukálják. *Saccharomyces* és *Aspergillus* fajoknál izolált szelenát rezisztens mutánsok vagy a szulfát-permeáz enzimben sérültek és a szelenátot carrier által nem tudták a sejtbe juttatni, vagy az intracelluláris szulfát redukcióban szereplő enzimek inaktivációjával a sejtbe bejutott szelenátot nem képesek toxikus szelenitté redukálni.

5.2.1.1. A mutánsok szelektálásához megfelelő szelenát koncentráció meghatározása

Első lépésben 5 *Schiz. pombe* törzs esetében meghatároztam a szelenát minimális gátló koncentrációját (M.I.C.-érték: Minimal Inhibitory Concentration) 4.3.5. szerint (5. táblázat).

5. táblázat Különböző szelenát-koncentrációk gátló hatása *Schiz. pombe* törzsekre, és azok M.I.C.-értékei

Na₂SeO₄ koncentráció	törzsek				
(mM)	B 579	RIVE 4-1-1	B 573	h ⁻ 0-82 <i>ade5</i>	R 421 <i>arg⁻/6-2</i>
0,8	-	-	-	-	-
0,4	-	-	-	-	-
0,2	*	*	-	-	-
0,1	-	++	*	*	*
0,05	+	++	+	+	+
0,025	+	++	++	++	++
0,0125	++	++	++	++	++
0,00625	++	++	++	++	++
0 (kontroll)	++	++	++	++	++
M.I.C.	0,1 mM	0,2 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,1 mM

- nincs növekedés

+ gyengébb szaporodás

* 1-1 telep megjelenése (spontán rezisztencia)

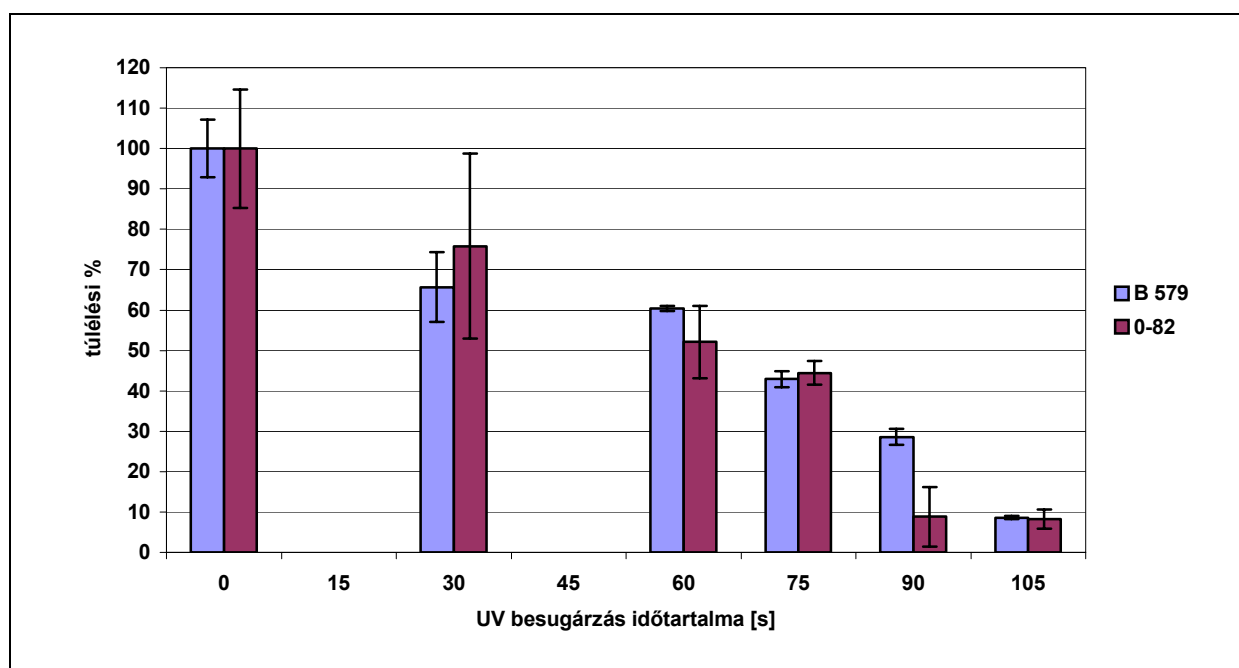
++ erősebb szaporodás

A mutánsok izolálásához a M.I.C. értékek alapján a 0,4 mM Na₂SeO₄ koncentrációt választottuk ki, a későbbiekben ez elegendőnek bizonyult a szenzitív törzsek megfelelő gátlásához, a mutáns törzsek egyértelmű elkülönítéséhez.

5.2.1.2. Mutánsok indukciójához megfelelő UV sugár-dózis meghatározása

A 4.3.7. szerint az egyre növekvő besugárzási idők függvényében felvettük a sejtek túlélési százalékát (túlélési görbe). Az eredményeket két törzs esetében (B 579 és 0-82) a 11. ábrán oszlopdiagram szemlélteti.

A mutánsok indukálásához általában az 5-10 %-os túléléshez tartozó mutagén-dózist ajánlják, hogy megfelelő mutációk már kialakuljanak, ugyanakkor még viszonylag nagy százalékban kapjunk túlélő sejteket, amelyek jól screenelhetők, a legjobb életképességű mutánsok szelektálásához. Eredményeink alapján tehát a megfelelő mutagén-dózisnak a 105 másodperces UV-besugárzást választottuk, a továbbiakban ezt a dózist használtuk mutáns törzsek indukálásához.



11. ábra Sejtek túlélési százaléka a *Schiz. pombe* B 579 és 0-82 törzs UV besugárzásának hatására

5.2.1.3. Szelenát rezisztens törzsek izolálása

13 szelenátra érzékeny, prototróf és auxotróf *Schiz. pombe* törzs UV besugárzásával, illetve kémiai mutagén kezelésekkel (4.3.8. és 4.3.9. szerint) összesen 117 szelenát-rezisztens mutáns törzset izoláltunk 0,4 mM Na₂SeO₄ koncentrációjú YEPD táplemezen (6. táblázat). Megannyi mutagenézishez használt törzs, a NCYC 1945 *met3-1* mutáns kivételével, a szulfát

metabolizmus tekintetében vad típusú volt. Az *met3-1* (Kohli et al., 1977) metionin auxotróf törzs fenotípusa szelenát-szenzitív volt, és ennél a törzsnél is lehetett szelenát-rezisztens mutánsokat izolálni.

A mutánsok genetikai stabilitását teszteltük a 4.3.10. szerinti vizsgálattal, illetve komplett (YEED) táptalajon a telepméret és morfológia vizsgálatával. A B 579 $\text{Se}^{\text{R}}-2$ és a 0-82 $\text{Se}^{\text{R}}-2$ szelenát rezisztens törzsek az 5×10^4 sejtszámmal végzett back mutációs vizsgálatban 100%-ig stabilnak mutatkoztak. A további mutáns törzsek a kisebb sejtszámmal (replikázással) végzett tesztben szintén stabilak voltak a szelenát-rezisztencia mutációt tekintve. Előfordultak ugyanakkor apró telepet képző, heterogén növekedésű törzsek, amelyeknél feltételeztük, hogy életképességük a random mutagenézis következtében erősen lecsökkent. Jellemző módon ilyen csökkent életképességet a többszörös mutációt hordozó törzseknél figyeltünk meg, amelyek a szelenát-rezisztencia mutáción kívül auxotrófia mutációval is rendelkeztek, elsősorban a leucin- és/vagy lizin- hiányos auxotróf törzsek.

6. táblázat Izolált szelenát rezisztens *Schiz. pombe* mutánsok

Törzs	Genotípus	Szelenát-rezisztens izolátumok	Mutagén kezelés
<i>S. pombe</i> L972	h^-	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-10$ -ig	UV
<i>S. pombe</i> L975	h^+	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-10$ -ig	UV
<i>S. pombe</i> 0-82	$h^- ade5$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-10$ -ig	UV
<i>S. pombe</i> 0-44	$h^- arg4$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-12$ -ig	UV, MNNG, EMS
<i>S. pombe</i> 0-172	$h^- leu3$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-10$ -ig	UV
<i>S. pombe</i> 0-121	$h^- arg1 tyr1$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-10$ -ig	UV
<i>S. pombe</i>	$h^+ leu1$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-10$ -ig	UV, MNNG, EMS
<i>S. pombe</i>	$h^+ lys1$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-12$ -ig	UV
<i>S. pombe</i>	$h^+ leu1 lys1$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-8$ -ig	UV
<i>S. pombe</i> NCYC 1945	$h^+ met3-1$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-10$ -ig	UV
<i>S. pombe</i> B579	h^- prototróf	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-5$ -ig	UV
<i>S. pombe</i> RIVE 4-1-1	prototróf	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-7$ -ig	UV
<i>S. pombe</i> RIVE 4-2-1	$arg^-/6-2$	$\text{Se}^{\text{R}}-1$ -től $\text{Se}^{\text{R}}-3$ -ig	UV

5.2.1.4. Szelenát-rezisztens mutánsok szelenát-toleranciájának vizsgálata

Megvizsgáltuk több szelenát-rezisztens törzs esetében, hogy a kialakuló mutáció következtében milyen magas szelenát koncentrációkat képesek tolerálni, a M.I.C.-érték hányszorosánál mutatnak még növekedést. A 7. táblázat utolsó oszlopában 5 törzs példáján látható, hogy a M.I.C.-érték 50 - 200-szorosát tolerálták a rezisztens törzsek.

7. táblázat Rezisztens mutánsok szelenát toleranciája az M.I.C.-érték viszonylatában

Törzs	Na ₂ SeO ₄ koncentrációk [mM]											M.I.C. érték [mM]	Na ₂ SeO ₄ tolerancia (x M.I.C.)
	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,6	3,2	5	10	20		
L. 975 Se ^S	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,2	
L. 975 Se ^R -1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		100
L. 972 Se ^S	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1-0,2	
L. 972 Se ^R -1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		100
0-82 Se ^S	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
0-82 Se ^R -2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-		100
B 579 Se ^S	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
B 579 Se ^R -2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		50
R. 421 Se ^S	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	
R. 421 Se ^R -1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		200

5.2.2. Szelenát-rezisztens *Schiz. pombe* mutánsok szulfát hasznosításának vizsgálata

Megvizsgáltuk az összes izolált mutáns esetében, hogy a szelenát-rezisztencia kialakulása együtt járt-e a szulfát hasznosítás képességének kiesésével. A kén-forrásra éheztetett sejt-tenyészetek növekedését kén-forrásként egyedül szulfátot tartalmazó táptalajon teszteltem. Az általam izolált *Schiz. pombe* mutáns törzsek kivétel nélkül elvesztették a szulfát-hasznosítás képességét a vad törzsekkel ellentétben, melyeknek a szulfát alapvetően jól hasznosítható kén-forrást jelent. Egyértelműen megállapítható tehát, hogy a *Schiz. pombe* esetében is a szelenát-rezisztencia mutáció hátterében a szulfát-redukciós anyagszereút sérülése áll.

5.2.3. Szelenát-rezisztens izolátumok genetikai komplementációjának vizsgálata

Az általam izolált szulfát-anyagszerében sérült *Schiz. pombe* törzsek esetében kérdéses volt, hogy a mutánsok egy, kettő, vagy akár több génben sérültek-e a rezisztenciát kialakító mutáció következtében. Buxton és mtsi (1989) *Aspergillus nidulans* és *Aspergillus niger* esetében két komplementációs csoportba sorolták a szelenát-rezisztens mutánsokat:

- a szulfát-permeázban sérült mutánsok kromát-rezisztens (CrO^R)
- a szulfát-reduktáz enzimben sérült mutánsok kromát-szenzitív (CrO^S)

fenotípussal rendelkeztek. Az eltérő komplementációs csoportba tartozó törzsek hibridizáció során komplementálták egymást, a hibridek a szelenátra érzékenyek, a szulfátot pedig képesek a táptalajból felvenni és redukálni.

5.2.3.1. Kromát-érzékenység illetve rezisztencia vizsgálata a *Schiz. pombe* mutánsoknál

Első lépésben megállapítottam 9 vad *Schiz. pombe* törzsnél a kromát minimális gátló koncentrációját: ez minden esetben $2,5 \times 10^{-3}$ M K_2CrO_4 koncentráció volt. Rezisztens törzsek elkülönítésével először a kétszeres M.I.C.-értéknél (5×10^{-3} M) próbálkoztam.

Mivel itt hosszú ideig (körülbelül 2 hetes inkubációt követően) sem tapasztaltunk növekedést, megpróbáltam alacsonyabb kromát koncentrációk alkalmazásával tesztelni a mutánsokat:

(a) $2,5 \times 10^{-3}$ M (M.I.C.-értéknél), (b) $3,0 \times 10^{-3}$ M és (c) $3,5 \times 10^{-3}$ M K_2CrO_4 koncentrációknál.

A beállított kromát-koncentrációk egyikén sem lehetett határozottan elkülöníteni rezisztens ill. szenzitív törzseket. A törzsek magasabb kromát-koncentrációk mellett egyáltalán nem növekedtek, a M.I.C.-érték körüli koncentrációban jelenlévő kromát esetében pedig időben igen elhúzódva, több mint két hetes inkubációt követően tapasztaltunk egy pázsit-szerű "háttérnövekedést". A továbbiakban több mutagénkezelés során próbálkoztunk kromát-rezisztens mutánsok izolálásával, mindahányszor sikertelenül. Nem nyertünk egyértelműen szelektálható kromát-rezisztens törzset.

5.2.3.2. Szelenát-rezisztens mutáns törzsek komplementációs analízise ivaros hibridizációval

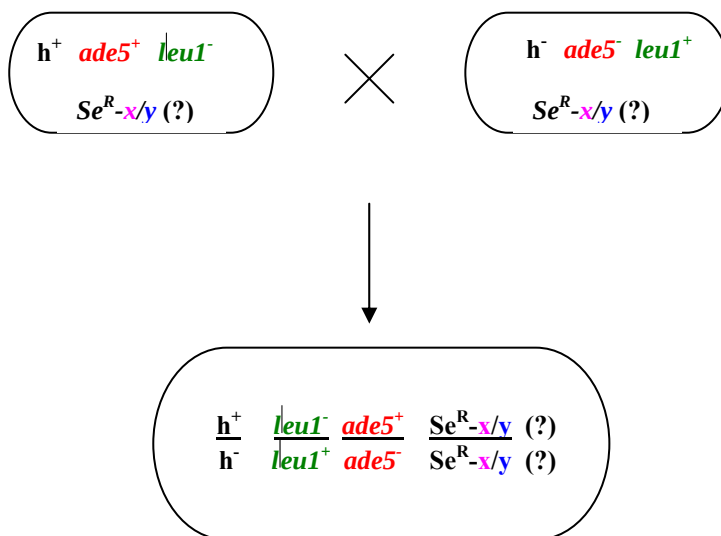
Az auxotrófia markereket hordozó szelenát rezisztens mutáns törzseket kereszteztük ivaros hibridizációval, hogy megvizsgáljuk, vannak-e közöttük egymást komplementáló törzsek a rezisztencia-mutáció illetve a szulfát-hasznosítás szempontjából.

A keresztezés lényegét mutatja a 12. ábra két auxotróf szelenát rezisztens törzs példáján.

Az ellentétes párosodási típusú (h^+ és h^-), egymást komplementáló auxotrófia mutációt hordozó törzsek keresztezése sikeres volt az auxotrófia markerek komplementációja alapján, azonban egyetlen keresztezésből sem kaptunk olyan hibrid törzset, mely a szervetlen szulfátot, mint egyedüli kén-forrást hasznosítani képes.

Haploid sejtek:

- ellentétes párosodási típusúak
- komplementáló auxotrófia mutációt hordozók
- szelenát-rezisztens, szulfátot nem hasznosító (szulfit⁻ ill. cys⁻)

**Diploid sejt:**

- prototróf (leu és ade) tekintetében
- szelenát rezisztens, szulfátot nem hasznosító (cys⁻ ill. szulfit⁻), ha a genotípus:

$\frac{Se^R-x}{Se^R-y}$ vagy $\frac{Se^R-y}{Se^R-x}$

Se^R-x Se^R-y

⇒ egy komplementációs csoportba tartozik a két mutáns törzs

- szelenát szenzitív, szulfátot hasznosító (cys⁺ ill. szulfit⁺), ha a genotípus:

$\frac{Se^R-x}{Se^R-y}$

Se^R-x Se^R-y

⇒ két komplementációs csoportba tartozik a két mutáns törzs

12. ábra A $h^+ leu1 Se^R-1$ és a $h^- 0-82 ade5 Se^R-1$ ivaros keresztezésének sematikus ábrázolása

Az eredményből arra következtethetünk, hogy az általunk izolált szelenát-rezisztens törzsek a szulfát-asszimilációs út azonos génjében sérültek. A hibridizált törzseket a 8. táblázat sorolja fel, az itt látható összes mutáns törzs egy komplementációs csoportba tartozik.

8. táblázat Ivaros hibridizációba bevont auxotróf, szelenát rezisztens *Schiz. pombe* mutánsok

A keresztezésbe bevont auxotróf törzsek	
h^+	h^-
$leu1 Se^R-1 - Se^R-10$	$0-82 ade5 Se^R-1 - Se^R-10$
$lys1 Se^R-1 - Se^R-12$	$0-44 arg4 Se^R-1 - Se^R-12$
$leu1 lys1 Se^R-1 - Se^R-8$	$0-172 leu3 Se^R-1 - Se^R-10$
	$0-121 arg1 tyr1 Se^R-1 - Se^R-10$

A szelenát-szenzitív AK 6/5 h⁻ *ade6⁻arg⁻* törzs és a szelenát-rezisztens B579 Se^R-2 mutáns törzs között végzett szomatikus hibridizációból (protoplasztfúzióból) jól spórázó hibrideket kaptam, ezért azokkal random spóraanalízist végeztem. Ennek eredményeképpen közel 1:1 arányban kaptam szelenát-rezisztens és szelenát-szenzitív klónokat, ami a szelenát-rezisztencia szempontjából az egyénes mutációra utal.

5.3. Vad típusú és szelenát-rezisztens *Schizosaccharomyces pombe* mutánsok kénforrás hasznosítása

A mutánsok izolálásához használt összes vad típusú és az azokból indukált számos szelenát-rezisztens mutáns törzs szaporodását vizsgáltuk különböző kénforrásokat tartalmazó táplevelesekben és az OD-értékek mérésével követtük a szerves és szervetlen kén vegyületek hasznosulását.

9. táblázat 6 vad törzs és az azokból származó 1-1 szelenát rezisztens mutáns törzs esetében mutatja az eredményeket. A 13. ábrán két-két szelenát szenzitív (L. 972 és B 579) illetve szelenát rezisztens (L. 972 Se^R-1 és B 579 Se^R-2) törzs szaporodási görbéi láthatók az egyedüli kénforrásként szulfát, szulfít, metionin vagy cisztein jelenlétében.

5.3.1. Szervetlen kén-vegyületek hasznosítása

Amint a 9. táblázat és a 13. ábra is mutatja, a szulfát kiváló kén-forrás a prototróf vad típusú (szelenát-szenzitív) törzsek számára. Némely szelenát-szenzitív auxotróf törzs lassabban növekszik, azonban egyértelműen hasznosítja a szervetlen szulfátot, azon, mint a táptalajban jelenlévő egyedüli kénvegyületen, növekedni képes.

Amint már említettem, az izolált szelenát-rezisztens *Schiz. pombe* mutánsok a szulfáton, mint egyedül jelenlévő kén-forráson, nem képesek növekedni. A szulfátot nem tudják redukálni és nem képesek beépíteni saját kén-vegyületeikbe, de az is kérdés, hogy egyáltalán transzportálják-e a sejtbe.

A szulfít mind a vad, mind pedig a rezisztens mutáns törzsek számára hasznosítható kén-forrásnak bizonyult. Alacsonyabb pH-értéken (pH= 3,8) az általunk alkalmazott szulfít koncentráció gátló hatást fejtett ki a *Schiz. pombe* törzsekre, hasonlóképpen mint azt

Saccharomyces cerevisiae törzsek esetében tapasztaltuk és ahogyan ez az irodalomból is közismert. A szulfit folyékony közegben ugyanis SO_2 , HSO_3^- illetve SO_3^{2-} formákban van jelen, de alacsony pH értékeknél a toxikus SO_2 forma felé tolódik az egyensúly.

A tioszulfát mind a szenzitív mind pedig a rezisztens törzsek számára jól hasznosítható 250 µg/ml - 1 mg/ml koncentráció tartományban, de nagyobb koncentrációban alkalmazva gátló hatással volt a szaporodásra.

5.3.2. Szerves kén-vegyületek hasznosítása

A szerves kénvegyületek közül a vad típusú törzsek a glutationt, a ciszteint, és a metionint is hasznosították, bár a glutation és a cisztein általánosan jobban hasznosuló, gyorsabban beépülő kénvegyületnek bizonyult, mint a metionin. Ez a megfigyelés alátámasztja Brzywczy és Paszewski (1994) eredményeit, akik *Schiz. pombe* esetében a reverz transz-szulfurilációs anyagcsereút hiányát írták le, mely szerint a hasadóélesztőben metioninból közvetlenül nem keletkezik cisztein két enzimmel katalizált lépésben.

A 13. ábrán is látható, hogy a vad törzsek metioninon sokkal lassabban, de felszaporodnak olyan mértékben, mint egyéb gyorsabban hasznosuló kénvegyület jelenlétében. A *Schiz. pombe* képes tehát a metionint felhasználni és kénvegyületeibe beépíteni, a cisztein azonban feltehetőleg nem transz-szulfurilációval, hanem valami egyéb anyagcsereúton keletkezik.

Figyelemre méltó eredmény az is, hogy a szulfát asszimilációban sérült (szelenát rezisztens) mutánsok a metionint ugyanúgy nem tudják felhasználni, mint a szervetlen kénvegyületek közül a szulfátot.

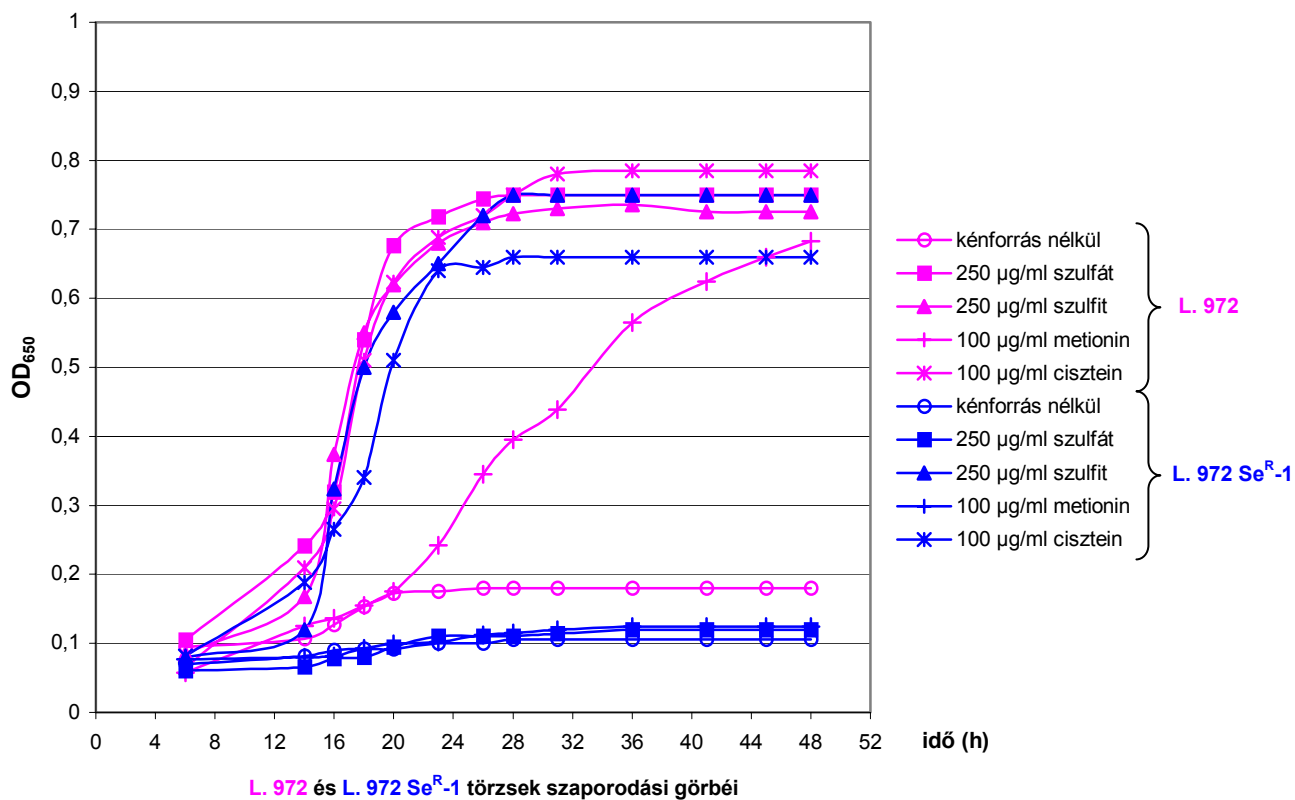
A rezisztens mutánsok glutation vagy cisztein jelenlétében életképesek voltak, mindkét szerves kénvegyületet jól hasznosították, a mutáció nem okozott változást, ugyanolyan jól szaporodtak a mutáns törzsek is, mint vad "párjaik".

9. táblázat Különböző szervetlen és szerves kén-források asszimilációja *Schiz. pombe* szelenát-szenzitív (vad típusú) és szelenát-rezisztens (mutáns) törzsek által

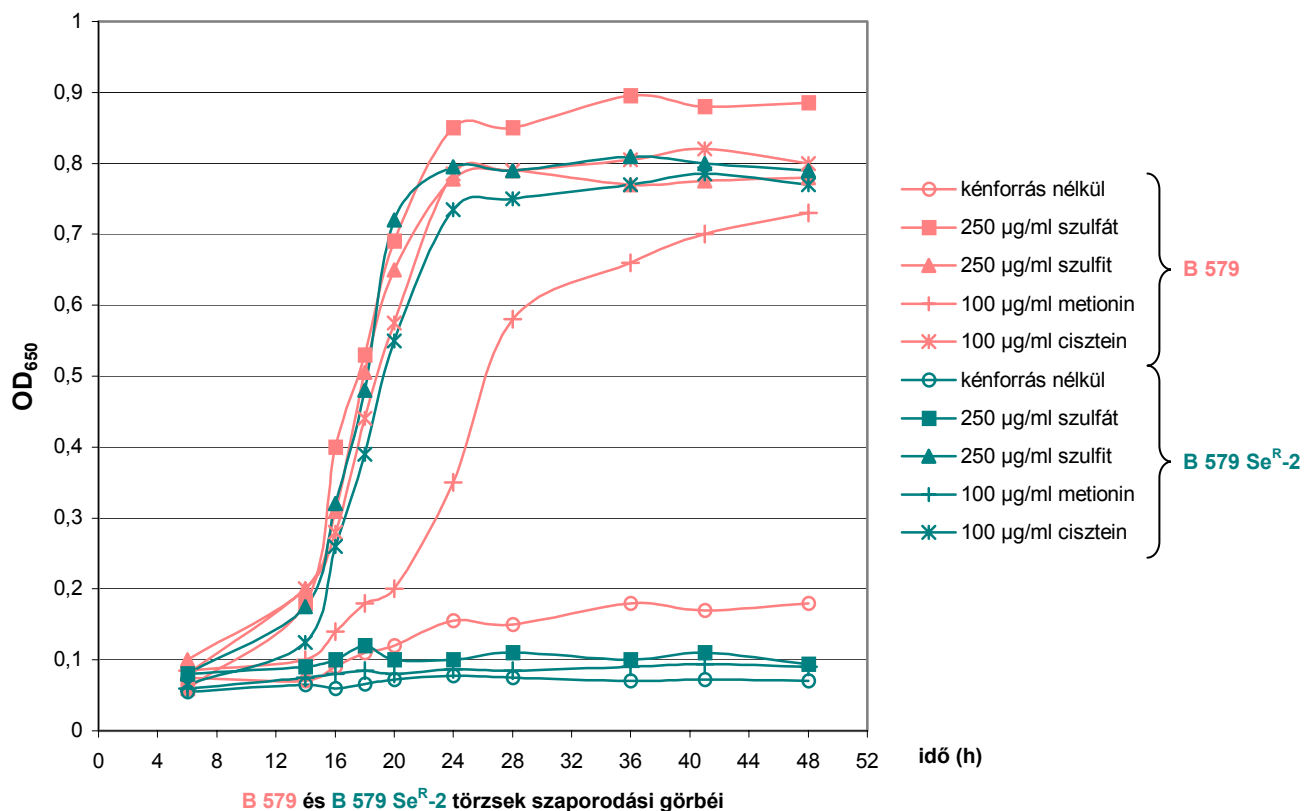
Törzs	Kén-forrás					
	szulfát 250 µg/ml	tioszulfát 250 µg/ml	szulfít 250 µg/ml	glutation 100 µg/ml	cisztein 100 µg/ml	metionin 100 µg/ml
L975	++	++	++	++	++	+
L975 Se ^R -1	-	++	++	++	++	-
L972	++	++	++	++	++	+
L972 Se ^R -1	-	++	++	++	++	-
0-82	++	++	+	++	++	+
0-82 Se ^R -2	-	++	+	++	++	-
B 579	++	++	++	++	++	+
B 579 Se ^R -2	-	++	++	++	++	-
RIVE 4-1-1	++	++	+	++	++	+
RIVE 4-1-1 Se ^R -1	-	++	+	++	++	-
NCYC1945 <i>met3-1</i>	-	-	-	-	-	+
NCYC 1945 <i>met3-1</i> Se ^R -1	-	-	-	-	-	-

++: erős növekedés (a késői exponenciális szaporodási fázist eléri 24 órán belül)
 +: gyenge növekedés (a késői exponenciális szaporodási fázis elérése 48 óra elteltével)
 -: nincs szaporodás

a/



b/



13. ábra Szelenát szenzitív és szelenát rezisztens törzsek szaporodása
szerves és szervetlen kénforrásokon
a/ *L.972* és *L.972 Se^R-1* b/ *B 579* és *B 579 Se^R-2*

5.4. Szelenát-rezisztens mutánsok szulfát transzportjának vizsgálata

A korábbi kísérleteimben izolált *Schiz. pombe* szelenát-rezisztens mutánsok esetében a rezisztencia kialakulása együtt járt a szulfát-hasznosítás képességének elvesztésével. Az ivaros hibridizációval végzett komplementációs analízis alapján ezek a szelenát-rezisztens törzsek egyetlen komplementációs csoportot alkottak (Bánszky és Maráz, 1997).

Mivel azonban a kromátra való rezisztencia alapján nem tudtuk eldönteni, hogy a mutánsok a szulfát transzportban sérültek-e, ezért ^{35}S -nel jelzett szulfát felvételével teszteltük a szulfát-permeáz enzim aktivitását. Arra kerestünk választ, hogy a szulfát-permeáz vagy a szulfát-redukciós út valamely más enzimének sérülése felelős-e a rezisztencia kialakulásáért.

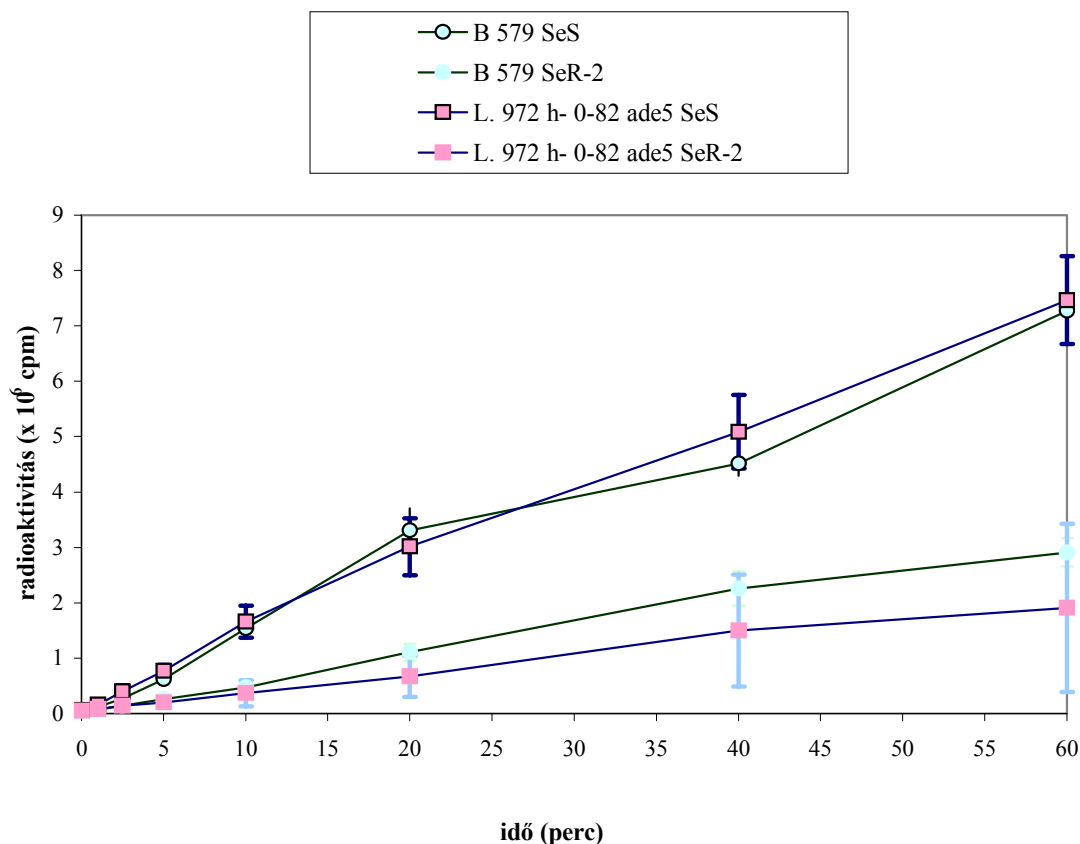
5.4.1. Vad és szelenát rezisztens mutánsok ^{35}S -szulfát felvétele

Több vad típusú illetve szelenát-rezisztens mutáns törzsnél vizsgáltuk az ^{35}S -szulfát felvételét a sejtekbe párhuzamos mérésekkel. A 14. ábrán a B 579 és 0-82 h⁻ *ade5* vad típusú törzsek és ezen törzsekből indukált B 579 Se^R-2 és h⁻ 0-82 *ade5* Se^R-2 rezisztens mutánsok radioaktivitás értékei láthatók.

Jól nyomonkövethető, hogy 60 perc elteltével a B 579 Se^R-2 törzs a B 579 vad törzs által felvett szulfát mennyiségnek csupán 54 %-át veszi fel.

A heterotallikus h⁻ 0-82 *ade5* Se^R-2 jelű mutáns esetében a 60. perc elteltével mindössze 20 %-os aktivitást mértünk a 0-82 *ade5* szelenát-szenzitív (vad) törzshöz viszonyítva.

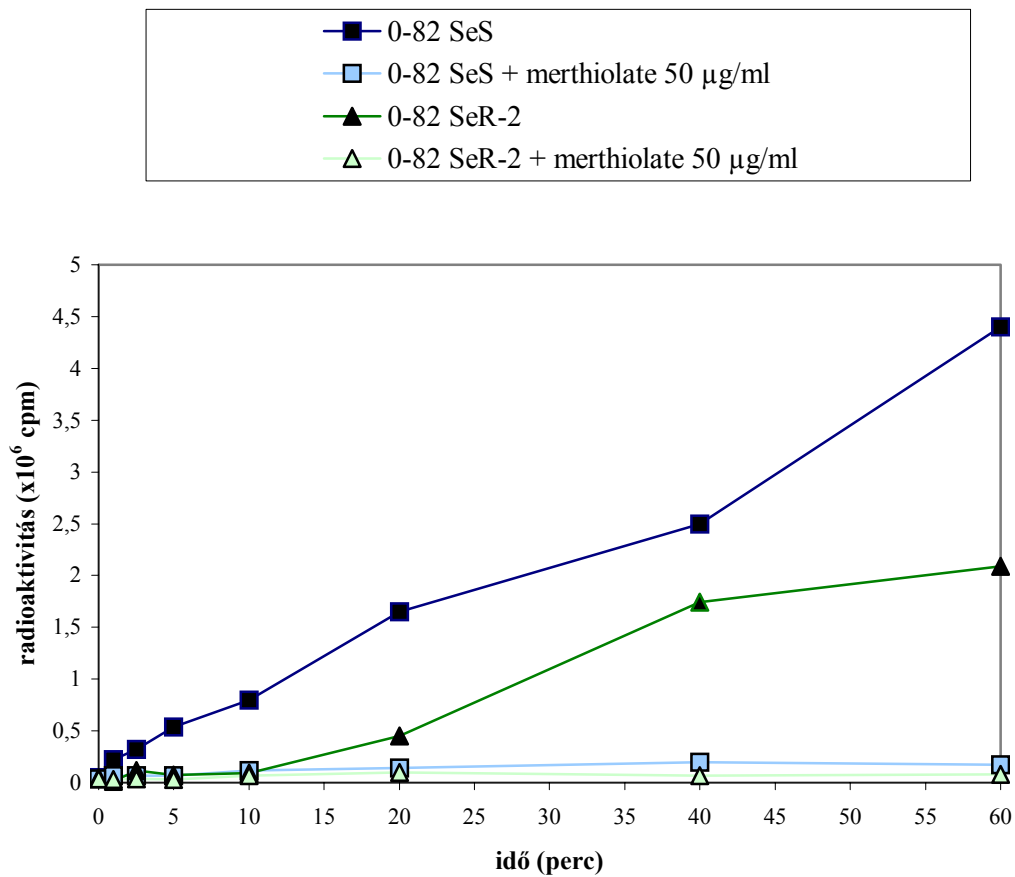
Többszöri párhuzamos vizsgálataink eredményeképpen megállapíthatjuk, hogy a vizsgált törzsek esetében a szelenát-rezisztens mutánsok szulfát-felvétele jelentősen elmarad a vad törzsekhez képest. Úgy tűnik, hogy a szulfát-permeázuk aktivitása csökken, de nem szűnik meg teljesen (Bánszky és Maráz, 1999).



14. ábra *Schiz. pombe* B 579 és 0-82 vad típusú (Se^S) törzsek és szelenát-rezisztens (Se^R) mutánsaik ^{35}S -szulfát felvétele

További vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a rezisztens mutánsok esetében mért radioaktivitás értékek nem az extracelluláris akkumuláció által, a sejtfalon adszorbeálódott szulfát mennyiségét jelentik-e.

Ennek a hatásnak a kiküszöbölésére a jelzett szulfát bemérését megelőzően mertioláttal - egy nem specifikus metabolikus inhibitorral – kezeltük a sejteket. Ezt a vegyületet patogén gombák rutinszerű előlésére használják, anélkül, hogy a sejt strukturáját megbontanák (Deighton és tsai, 1979). Az 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ koncentrációban mertioláttal kezelt mintáknál a vad- és a rezisztens mutáns törzsnél is teljes gátlást tapasztaltuk (15. ábra).



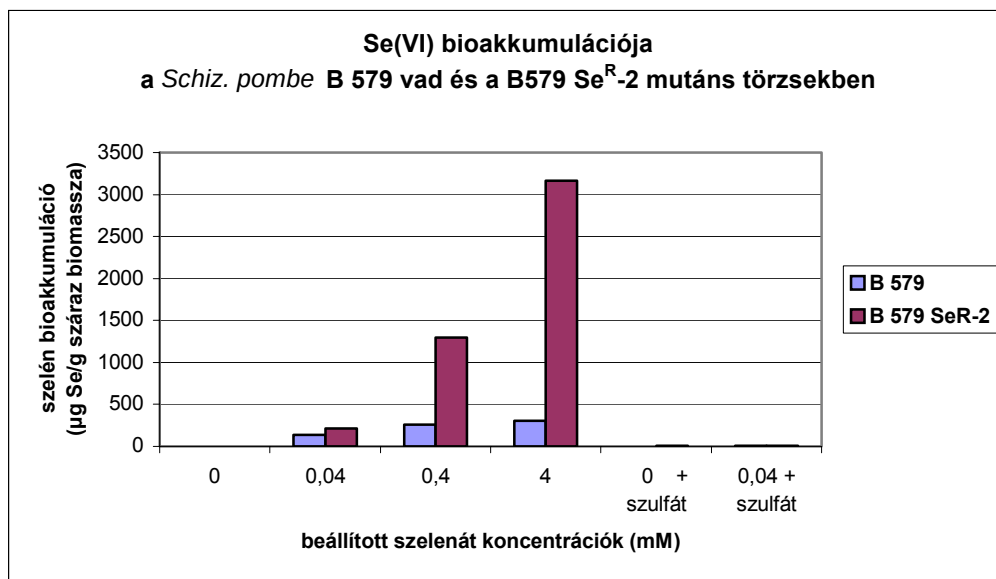
15. ábra ^{35}S -szulfát felvételének gátlása mertioláttal (50 $\mu\text{g/ml}$) *Schiz. pombe* 0-82 szelenát-szenzitív (Se^{S}) és rezisztens ($\text{Se}^{\text{R-2}}$) törzseknél

Ebből arra következtettünk, hogy a rezisztens mutánsok esetében mért csökkent szulfát akkumuláció egy csökkent mértékű intracelluláris akkumuláció, és permeáz által irányított (közvetített) szulfát transzport létezésére utal a *Schiz. pombe* esetében.

5.4.2. Szelén bioakkumuláció vad és szelenát rezisztens törzsnél

Egy további vizsgálatban a vad és mutáns sejtek szelén akkumulációját mértük a B 579 és B 579 Se^R-2 mutáns esetében, amelynek a szulfát felvétele kb. a felére csökkent a vad törzshöz képest.

Különböző szelenát koncentrációkat állítottunk be és szulfát jelenlétében is vizsgáltuk a szelén akkumulációt, hogy a feltételezett kompetíció mennyiben befolyásolja a szelenát felvételét (4.3.16. szerint). A mérési eredményeket a 16. ábrán tüntettem fel.



16. ábra A szelén(VI) bioakkumulációja a B 579 vad típusú törzs és a szelenát-rezisztens B 579 Se^R-2 mutáns esetében

Az M.I.C. értéknél alacsonyabb 0,04 mM szelenát koncentrációnál a mutáns törzs kb. 1,5-szer annyi szelént akkumulált, mint a szenzitív "párja". 0,4 mM koncentráció beállításánál a mutáns törzs szelén akkumulációja már jelentősen meghaladja a vad törzsét, egy nagyságrenddel több szelént akkumulálva is jól szaporodik. Ez azt bizonyítja, hogy a *Schiz. pombe*-ban szintén elsősorban a redukált szelenát, a szelenit fejt ki toxikus hatást.

Szulfát adagolása a táptalajba csökkentette a szelén akkumulációt (és a szelenát gátló hatását) mind a vad, mind pedig a mutáns törzsben. A szelenát és a szulfát kompetíciója azt mutatja, hogy a szelenát valóban a szulfát transzport rendszeren keresztül jut be a sejtbe.

5.5. Szelenát rezisztens és vad típusú *Schiz. pombe* törzsek erjedési illékony komponenseinek és almasavbontásának összehasonlítása mikrovinifikációs körülmények között

A dolgozat ezen fejezete azokat a mérési eredményeket tartalmazza, amelyekben az általam izolált mutáns törzsek illetve vad típusú "párjaik" borászati szempontból fontos tulajdonságait teszteltük és hasonlítottuk össze.

5.5.1. Vad típusú és mutáns törzsek kén-hidrogén termelésének vizsgálata

A *Schiz. pombe* törzsek kén anyagcseréjével elsősorban azért foglalkoztunk, hogy egy a borászati gyakorlatban alkalmazható, a vad típusú törzsekkel ellentétben, csökkentett H₂S-termelő törzset fejlesszünk ki. A szelenát rezisztens mutánsok szulfát redukciója gátolt, ezért a mustban vagy borban lévő szulfátból nem termelnek kén-hidrogént a szulfát asszimilációs úton. Ettől azt vártuk, hogy a mutáns törzsek H₂S termelése a vad típusúakkal szemben visszaszorul.

5.5.1.1. Vad és mutáns törzsek kén-hidrogén termelésének szűrése ólom-acetátos módszerrel

A vad típusú és mutáns törzsek kén-hidrogén termelésének szűrése során egy szemi-kvantitatív módszerrel, ólom-acetátos papírcsíkok H₂S hatására történő fekete elszíneződésével teszteltünk számos törzset. A méréseket különböző szerves és szervetlen kén-forrásokat tartalmazó minimál illetve komplett (YEPD) táptalajon végeztük, a lombikok szájához erősített, a fermentációs gáztérbe nyúló, ólom-acetáttal átitatott papírcsíkokkal. A szűrési vizsgálatba bevontunk két *Saccharomyces cerevisiae* törzset is (Oenoferm és S288c). Eredményeink szerint ezek nem termeltek detektálható mennyiségű H₂S-t, míg a vad típusú *Schiz. pombe* törzsek mind szervetlen (szulfáton és szulfíton), mind pedig a szerves (ciszteinen) mérhető mennyiségű H₂S termelést mutattak.

A 10. táblázatban néhány törzs vizsgálati eredményeit tüntettem fel (- kék háttérszínezéssel a mutáns törzsek kiemelve).

A szűrési vizsgálatok eredményeit csak lényegüket tekintve röviden említem:

- A vad törzsek között is megfigyelhetőek határozott különbségek (egymáshoz viszonyítva voltak erősebb és gyengébb kén-hidrogén termelők (pl. az R 4-1-1 törzs erős mértékben,

L.972 és L.975 törzsek közepes mértékben, a B 579 törzs kis mennyiségben termelt kén-hidrogént)

- Érdekes módon a két izogénikus törzs (L.972 h⁻ és L.975 h⁺) között is volt különbség: az L.972 törzs erősebb kén-hidrogén termelőnek bizonyult.
- A szelenát-rezisztens mutáns törzsek szervesen kénforrásokon nem, csupán a ciszteinen termeltek kimutatható mennyiségű kén-hidrogént

10. táblázat *Schiz. pombe* és *S. cerevisiae* törzsek H₂S termelése MM-S⁻ táplevesben (75 ml tápleves, 100 ml Erlenmeyer lombikban, beoltás: 10⁶sejt/ml, inkubáció: 30°C, 5 nap)

		H ₂ S termelés		
Törzsek		Szulfát 0,25%	Szulfid 0,25%	Cisztein 100 µg/ml
<i>S. cerevisiae</i>	oenoferm	-	-	-
	S 288c	-	-	-
<i>Schiz. pombe</i>	L. 972	+++	++	+++
	L. 975	++	++	++
	B 579	+	+	+
	B 579 Se ^R -2	-	-	(+)
	R 4-1-1	++++	+++	++++
	R 4-1-1 Se ^R -3	-	+	++
	lys1	++	+	++
	lys1 Se ^R -5	-	-	+
	0-44 arg4	++	++	++
	0-44 arg4 Se ^R -1	-	-	-

Értékelés: önkényes skála szemrevételezés alapján

- nem termel H₂S-t

(+) elenyésző H₂S termelés (nagyon halvány elszíneződés, kis területen)

+ gyenge H₂S termelés (halvány elszíneződés, viszonylag kis területen)

++ közepes H₂S termelés (közepes elszíneződés)

+++ erős H₂S termelés (erősebb mértékű elszíneződés)

++++ nagyon erős H₂S termelés (nagyon erős elszíneződés)

Kénforrásként egyedül metionint tartalmazó minimál táptalajon nagyon gyenge elszíneződést tapasztaltunk a vad törzseknél is, a mutánsok esetében pedig nem detektáltunk H₂S termelést. Ez azzal magyarázható, hogy a metionin korábbi vizsgálataink során rosszul hasznosuló kénforrásnak bizonyult, a szaporodás mértéke is elég gyenge volt. A mutánsok esetében kénforrásként egyedül szulfát illetve metionin jelenlétében már a szaporodás is elmaradt, tehát nem véletlen a visszaszoruló H₂S termelés. A mutánsok azonban YEPD komplett táptalajban is kevesebb H₂S-t termeltek, mint a vad "párjaik", ahol a szaporodásuk mértéke megegyezik.

5.5.1.2. Vad és mutáns törzsek kén-hidrogén termelésének mérése táptalajban, mustban és borban fotometriás módszerrel

A törzsek kén-hidrogén termelésének kvantitatív jellemzése érdekében a továbbiakban egy fotometriás analitikai eljárást adaptáltunk és optimalizáltunk Jiranek és mtsi (1995) módszere alapján. A kén-hidrogén termelés mérését végeztük YEPD komplett táptalajban, mustban illetve borban történt fermentációt követően. (A fermentációs paramétereket és a mérési módszer leírását a 4. fejezet 4.3.18. pontjában találjuk.)

A mérési eredményeket a 11. táblázat tartalmazza. Látható, hogy a mutáns törzsek egyik kísérletben sem termeltek a kimutatási határ fölé eső mennyiségben kén-hidrogént. A vad törzsek kén-hidrogén termelése a különböző kísérlet-sorozatokban viszonylag nagy ingadozást mutatott, de az L. 972 törzs és az abból származó adenin-hiányos auxotróf 0-82 jelű törzs nagyobb mennyiségben termel kén-hidrogént, mint a kénezett mustból izolált B 579 jelű törzs.

11. táblázat Kén-hidrogén termelés YEPD komplett táplevesben, mustban és borban

Törzs	H ₂ S (µg / l)		
	YEPD táptalajon	MUST erjesztése	BOR erjesztése
L. 972 Se ^S	158,3 ± 70	370 ± 36	19,75 ± 2,5
L. 972 Se ^R -1	-	-	< 10
0-82 Se ^S	175 ± 49,5	-	-
0-82 Se ^R -2	< 10	-	-
B 579 Se ^S	78,3 ±	119 ± 36,5	12,38 ± 0,9
B 579 Se ^R -2	< 10	< 10	< 10

< 10 µg/l (nem termeltek, vagy csak 10 µg/l alatti koncentrációtartományban)

- : nincs adat (nem végeztünk mérést)

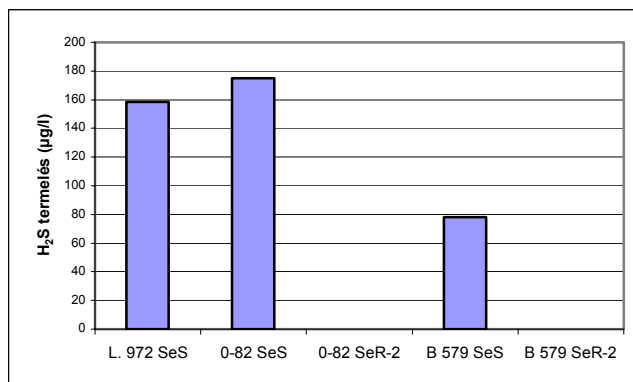
Mustban végzett fermentáció során az L. 972, a B 579 vad és B579 Se^R-2 rezisztens törzs kén-hidrogén termelését mértük. A rezisztens törzs nem, a szenzitívek azonban viszonylag nagy mennyiségben termeltek kén-hidrogént.

Borban csak 1% glükóz adagolása mellett tudtunk kén-hidrogén termelést detektálni, de még ilyen körülmények között is nagyon gyenge volt a törzsek szaporodása és kén-hidrogén termelése.

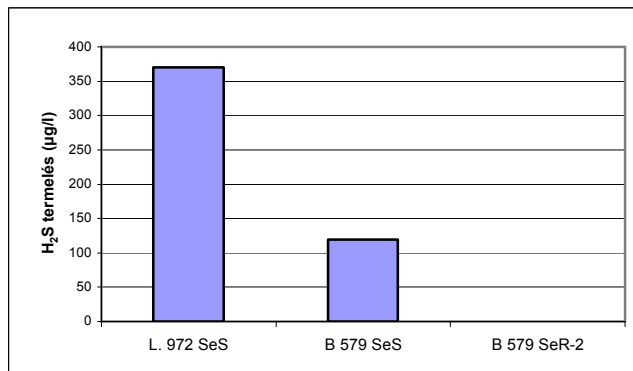
A 17. ábrán oszlopdiagram szemlélteti a törzsek által a különböző közegekben termelt kén-hidrogén mennyiségeket. Látható, hogy a legerősebb kén-hidrogén termelés a mustban figyelhető meg, a leggyengébb pedig a borban. YEPD táplevesben kb. 6-8-szoros, mustban

pedig 10-18-szoros kénhidrogén mennyiségeket mértünk, mint a borban. Az eltérő fermentációs körülmények és az elért szaporodási ráták (vagy a végső sejtkoncentrációk: mustban $1,2 \times 10^8$ sejt/ml, YEPD-ben 2×10^7 sejt/ml, borban 4×10^6 sejt/ml) figyelembevételével magyarázhatók a különbségek. A módszer leírásánál (4.3.18.) látható, hogy a fermentációk időtartama sem egyezik meg a különböző közegek esetében. Előkísérletekkel vizsgáltuk, mely fermentációs időpontban érjük el a legmagasabb H_2S szintet, hogy mindenhol azt az időpontot válasszuk, ahol a legtöbb kén-hidrogént tudjuk detektálni, a törzsek közötti legszembetűnőbb különbségek kimutatására. Az elsődleges kérdés ugyanis az volt, hogy a vad és mutáns típusok között találunk-e eltérést. YEPD-ben a 2. napra biztosan elértük a legmagasabb H_2S szintet, borban kb. az 5. napon, mert itt a szélsőséges körülmények között nagyon lassú és gyenge szaporodás volt. A mustot addig erjesztettük, míg kiejert az eredeti magas refrakció tartalma és már nem csökkent tovább; ez 2 hét volt.

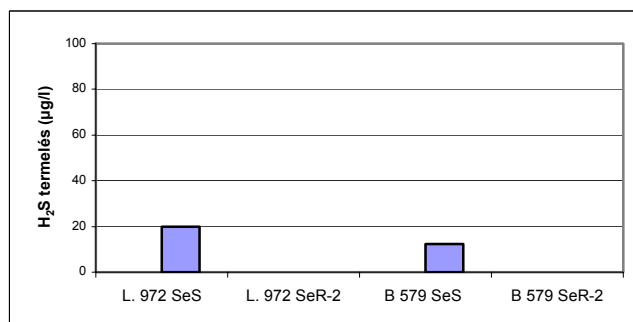
**a/ H_2S termelés
YEPD-ben**



**b/ H_2S termelés
mustban**



**c/ H_2S termelés
borban**



17. ábra Szelenát szenzitív vad típusú és szelenát rezisztens mutáns *Schiz. pombe* törzsek kén-hidrogén termelése komplett YEPD táptalajban (a), mustban (b) és borban (c)

5.5.2. Vad típusú és mutáns törzsek által termelt illékony komponensek

Komplett táptalajban, illetve mustban végzett fermentációt követően aromaszpektrum vizsgálatokat végeztünk a Központi Élelmiszertudományi Kutató Intézet Kémiai Analitikai Osztályának laboratóriumában GC-MS technikát alkalmazva.

Két vad és egy kiválasztott mutáns törzs erjedési aromaszpektrumát vizsgáltuk 3-3 párhuzamosban. A két vizsgált vad törzsnél elég nagy különbség adódott megelőző mérések során a kén-hidrogén termelés tekintetében, a B 579 törzs gyenge kén-hidrogén termelő. A B 579 Se^R-2 mutáns nem termelt kén-hidrogént és tudjuk, hogy a szulfát redukciós anyagcseréje sérült. Az volt a kérdés, hogy egyéb, az élesztőtörzsek által termelt aromakomponensek mennyiségében is megmutatkoznak-e a törzsek közötti különbségek.

A 12. táblázatban komplett YEPD táptalajban végzett fermentációt követően, a 13. táblázatban pedig must erjesztése során képződött aromakomponensek mennyiségét tüntettem fel. Mivel belső standardot nem használtunk, az aromakomponensek mennyiségi értékelését az abszolút csúcsterületek összehasonlításával végeztük. A táblázatokban az átlagértékeket és a szórást tüntettem fel, az egyszerűség kedvéért az abszolútértékek százszázalékos részeként. (Egy-egy minta teljes ionáram kromatogramját 2.-7. mellékletként fűztem be.)

A legtöbb azonosított vegyület észter volt amiatt, hogy az alkalmazott SPME szál elsősorban a kevésbé poláros vegyületeket köti meg. Az aromakomponensek mennyiségének eltéréseit a két vad törzs között hasonlítottam össze és értékeltem t-próbával illetve a B 579 vad és az abból mutagénkezeléssel előállított B 579 Se^R-2 mutáns törzs között szintén t-próbával (95%-os szignifikancia szinten). A táblázatokban a jobb átláthatóság kedvéért a t-próba eredményeként kapott szignifikáns különbségeket ($p \leq 0,05$) sárga háttérszínezéssel emeltem ki.

YEPD táplevesben az L. 972 szignifikánsan több etil-oktanoátot és etil-9-decenoátot, valamint erősen szignifikánsan több etil-dekanoátot termelt, mint a B 579. A B 579 és mutánsa között csak az etil-dodekanoát mennyiségében adódott erősen szignifikáns eltérés. Az L. 972 és B 579 törzsek aromaszpektruma között tehát nagyobb különbség volt a YEPD-ben végzett fermentáció során, mint a B 579 vad és mutáns "párja" között.

12. táblázat *Schiz. pombe* törzsekkel erjesztett YEPD tápvelés aromakomponenseinek összehasonlítása (csúcsterület/100 000)

Retenciós idő	Vegyület	L.972		t próba L.972 B 579	B 579		t próba B 579 B 579 Se ^R -2	B 579 Se ^R -2	
		átlag	szórás	p érték	átlag	szórás	p érték	átlag	szórás
1,52	acetaldehid	84,20	20,18	0,4651	94	12,73	0,1475	111,17	47,37
	etanol	1187	145	0,1652	985,7	60,8	0,1867	1516	449
6,00	etil-hexanoát	1,30	0,08	0,0644	0,84	0,15	0,1612	1,20	0,22
7,51	nonanal	8,50	1,87	0,9537	8,37	2,42	0,8570	9,03	4,48
8,09	oktil-acetát	4,47	1,60	0,7538	4,27	1,12	0,4534	5,47	1,17
8,32	oktánsav	2,23	0,66	0,4080	1,60	0,00	0,0903	1,95	0,07
8,67	etil-oktanoát	90,03	27,38	0,0368	21,8	4,33	0,4143	16,97	3,93
8,80	dekanal	14,27	3,15	0,1933	9,40	1,25	0,2814	15,63	8,57
9,18	3-metil-1-butyl-észter	2,60	0,92	0,5958	2,43	0,64	0,2577	3,77	0,90
9,80	etil-nonanoát	2,93	1,35	-	na	na	-	2,10	0,85
10,11	metilészter	2,83	0,49	0,9443	2,9	1,04	0,1767	3,60	0,75
10,52	dekánsav	7,11	1,85	0,1375	3,23	1,25	0,0636	4,60	1,84
10,76	etil-9-decenoát	5,93	1,10	0,0451	1,45	0,21	-	na	na
10,86	etil-dekanoát	551,6	123,6	0,0218	113,3	11,92	0,1004	83,60	7,84
11,02	dodekanal	4,90	0,69	0,2136	3,80	0,40	0,2616	5,03	1,70
12,80	etil-dodekanoát	21,73	1,70	0,0687	34,97	2,71	0,0034	5,27	0,74
17,24	etilészter	5,00	3,25	0,7048	6,13	4,42	0,7800	3,15	1,06
	összes illó	1994,40	320,12	0,0735	1261,81	48,03	0,1904	1784,73	504,49
	összes illó etanol nélkül	807,20	175,55	0,0514	276,14	59,50	0,8560	268,60	63,03

na: nincs adat

13. táblázat *Schiz. pombe* törzsekkel erjesztett mustok aromakomponenseinek összehasonlítása (csúcsterület/100 000)

Retenciós idő	Vegyület	L.972		t próba L.972 B 579	B 579		t próba B 579 B 579 Se ^R -2	B 579 Se ^R -2	
		átlag	szórás	p érték	átlag	szórás	p érték	átlag	szórás
1,52	acetaldehid	49,90	36,95	0,3417	75,33	1,59	0,0612	31,13	0,26
	etanol	4550	507	0,0587	5979	320,9	0,1218	4741	536
6,00	etil-hexanoát	13,90	1,73	0,0592	25,48	2,8	0,0936	15,10	3,90
7,51	nonanal	5,47	0,55	0,8178	5,18	1,49	0,2419	4,37	0,90
8,09	oktil-acetát	5,23	0,78	0,2106	4,06	1,37	0,9877	4,03	1,16
8,32	oktánsav	12,07	0,47	0,4433	14,53	4,54	0,8310	15,17	0,21
8,67	etil-oktanoát	216,7	34,06	0,0545	438,2	62,8	0,0499	189,5	49,59
8,80	dekanal	6,13	1,12	0,4324	10,43	6,52	0,1869	3,87	0,81
9,18	3-metil-1-butil-észter	2,37	0,31	0,2439	1,83	0,10	0,5879	2,67	0,84
9,80	etil-nonanoát	2,83	0,50	0,0687	3,93	0,55	0,1088	2,17	0,67
10,11	metilészter	1,57	0,35	0,7951	1,45	0,07	0,4999	1,55	0,07
10,52	dekánsav	11,27	0,70	0,2136	7,23	3,95	0,1693	11,30	0,96
10,76	etil-9-decenoát	39,43	2,70	0,0549	52,45	1,98	0,0016	8,23	1,15
10,86	etil-dekanoát	516,4	50,96	0,0641	381	36,35	0,1685	497,50	80,61
11,02	dodekanal	4,50	0,96	0,4060	5,13	1,29	0,2911	3,73	1,53
12,80	etil-dodekanoát	21,03	4,88	0,1149	12,43	3,06	0,0096	101,8	18,28
17,24	etilészter	7,10	1,85	0,0211	0,7	0,28	0,0551	0,13	0,02
	összes illó	5620	530	0,0547	7028	379,2	0,1304	5642	692
	összes illó etanol nélkül	1070	66,5	0,0732	1049	58,3	0,1853	901,4	157,4

Must erjesztésénél érdekes módon pont ellenkezőleg, a két vad törzs aromaspektruma jobban hasonlított egymásra, csupán az etilészter mennyisége volt erősen szignifikánsan több az L. 972 törzs esetében. A B 579 és B 579 Se^R-2 törzsek által erjesztett mustok aromaanyagait összevetve a B 579-es szignifikánsan több etil-oktanoátot, erősen szignifikánsan több etil-9-decenoátot, erősen szignifikánsan kevesebb etil-dodekanoátot tartalmazott.

Az etil-észterek (pl. az etil-oktanoát, etil-9-decenoát, etil-dekanoát, etil-dodekanoát), amelyek mennyiségében szignifikáns eltéréseket mutattunk ki a különböző törzsek között, a borok másodlagos aromaanyagainak legnagyobb csoportját képezik és bizonyos gyümölcsös karakterek kialakításával járulnak hozzá a borok aromájához (Vas és mtsi, 1999). A másodlagos aromaanyagok mennyisége a borban szintén összefügg az erjesztést végző élesztőtörzsek metabolizmusával (Lambrechts és Pretorius, 2000). Azonban az általunk is mért szekunder metabolitok (szerves savak, magasabbrendű alkoholok és észterek, aldehidek) összhatása, ezek abszolút mennyisége és specifikus részaránya alakítja ki a bor aromáját. Emiatt pontosan nem lehet tudni az analitikai vizsgálatok alapján, hogy az általunk detektált eltérések megnyilvánulnak-e és ha igen, milyen mértékben az érzékszervi tulajdonságokban (íz, illat).

5.5.3. Almasavbontás vizsgálata a szelenát-rezisztens mutáns törzsekkel

Az alábbi kísérletekben a B 579 ill. 0-82 vad és a B 579 Se^R-2 ill. 0-82 Se^R-2 szelenát rezisztens törzsek almasavbontását teszteltük. Elsősorban arra kerestük a választ, hogy a mutáns törzsek megtartották-e a vad törzsekhez hasonló mértékű almasavbontó képességüket. A mutánsok kén-hidrogén termelését sikerült csökkenteni, ezáltal felmerülhet borászati alkalmazásuk lehetősége, amennyiben az almasavbontó képességük nem romlott.

Az almasavbontást komplett YEPD táplevesben és kétféle eredetű savas száraz fehér újborkban mértük két különböző kísérletsorozatban. Nagy induló sejtszámmal (10^7 sejt/ml) kezdtük a fermentációt, mert a borban előzetes kísérletek eredményei alapján számítottunk a törzsek igen gyenge szaporodásra. A borokban csupán kismértékű (kb. 1,4x-2,2x-es) sejtszám-növekedést tapasztaltam az 5 napos fermentációs idő végén. A YEPD tápleves 10 g/l L-malátot tartalmazott,

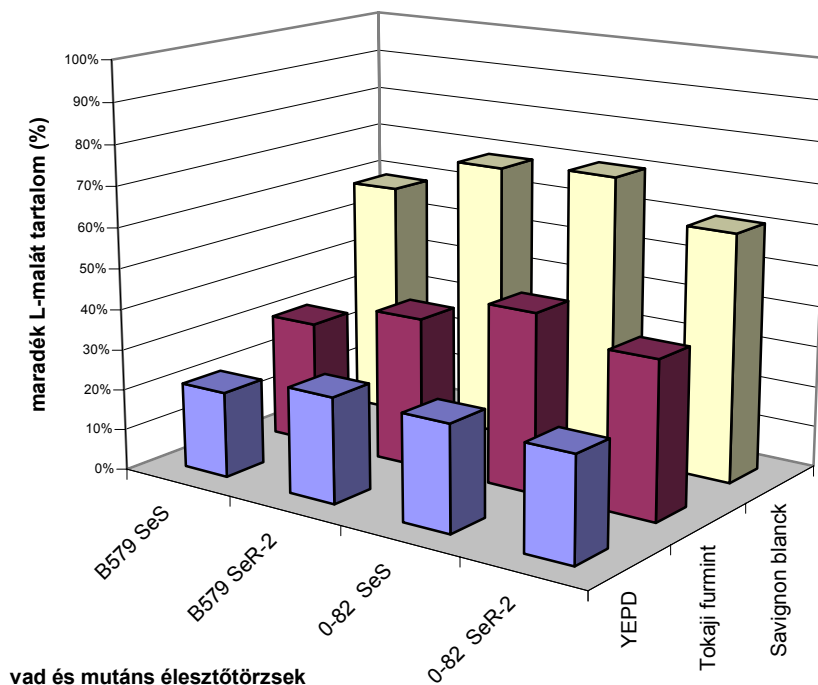
amelyben a szaporodás elért egy nagyságrendnyi növekedést (kb. 10x-es sejtszámnövekedés) az 5. nap végére. A borok kiindulási almasavtartalma 5,46 illetve 5,8 g/l volt.

A 14. táblázat eredményeiből kiolvasható és az oszlopdiagram (18. ábra) is jól szemlélteti, hogy a szelenát rezisztens törzsek a vad típusú törzsekhez hasonló mértékben bontják az almasavat, azaz a mutáció nem befolyásolta az almasavbontó képességüket.

Komplett táptalajban erősebb almasavbontást végeznek a törzsek mint a borban, ami a jobb szaporodási rátával is magyarázható.

14. táblázat Szelenát szenzitív (vad) és szelenát rezisztens (mutáns) *Schiz. pombe* törzsek almasavbontása komplett táplevesben és borban 5 nap alatt

vad és mutáns <i>Schiz. pombe</i> törzsek	YEPD komplett táptalaj (kiindulási L-malát tart.: 10 g/l)			Sauvignon blanc (kiindulási L-malát tart.: 5,46 g/l)			Tokaji Furmint (kiindulási L-malát tart.: 5,8 g/l)		
	Almasavtartalom (L-malát)								
	g/l			g/l			g/l		
	átlag	szórás	maradék almasav tartalom	átlag	szórás	maradék almasav tartalom	átlag	szórás	maradék almasav tartalom
B 579	2,10	±0,28	21 %	3,23	±0,38	59 %	1,77	±0,05	30,5 %
B 579 Se ^R -2	2,62	±0,17	26 %	3,75	±0,17	68,5 %	2,15	±0,15	37,1 %
0-82	2,63	±0,37	26 %	3,84	±0,22	70,3 %	2,55	±0,13	44 %
0-82 Se ^R -2	2,55	±0,63	25,5 %	3,34	±0,32	61 %	2,24	±0,09	38,6 %



18. ábra Szelenát szenzitív (vad) és szelenát rezisztens (mutáns) *Schiz. pombe* törzsek almasavbontása komplett táplevesben és két különféle borban 5 napos fermentáció során

5.5.4. Vad és mutáns törzsekkel kezelt borok érzékszervi vizsgálata

Az előbbi fejezetben leírt kísérletekben malo-etanolos fermentációak (MEF) alávetett újborkkal érzékszervi analízist végeztünk. Azt vizsgáltuk, hogy a vad és mutáns *Schiz. pombe* törzsekkel kezelt borokban érzékszervileg érezhető mennyiségben találunk-e kén-hidrogént, vagy egyéb idegen aromát, illetve az eredendően igen savas borok savtartalma az MEF után érezhetően csökkent-e.

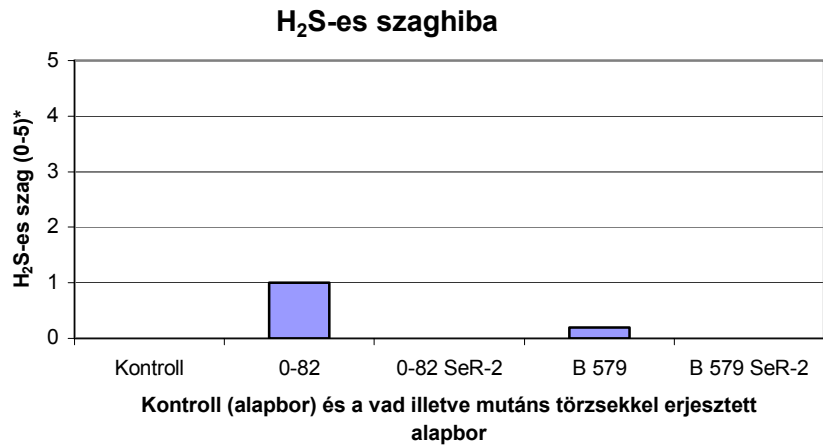
Öt bíráló vizsgálta a kísérleti erjesztésből származó borokat (3-3 párhuzamosban), 0-5 pontig értékelve a következő organoleptikus paramétereket: (1) kén-hidrogénes illat és íz, (2) egyéb hibás aroma, (3) savhatás (az erősen savas kontroll borhoz képest).

Az eredményeket a 19. ábra mutatja. Enyhe kén-hidrogénes illatot érezni lehetett a 0-82 törzs által kezelt borban, míg ez a másik B 579-es törzsnél csak nyomokban volt érezhető, a szelenát rezisztens mutáns törzsek esetében pedig egyáltalán nem éreztek kén-hidrogén szagot. Az ábra "c" részében látható, hogy a savcsökkenés is érezhető volt a *Schizosaccharomyces*-ekkel kezelt borokban, de a borok eredeti savassága nem tűnt el teljesen, a kezelt borok is viszonylag savasak maradtak. A kezeletlen újborhoz (kontroll minta) képest igen gyengén idegen aroma érezhető volt a *Schizosaccharomyces* törzsekkel fermentált mintákban, a legjelentősebb eltérés a B 579 törzs esetében adódott.

A fermentáció 5 napig tartott és a borokban csupán kb. 1,4x-2,2x-es sejtszám-növekedést kaptunk. Ennek megfelelően a sejtek aktivitása elég gyenge volt, tehát nem is várható nagyon erős savcsökkenés és aromatermelés.

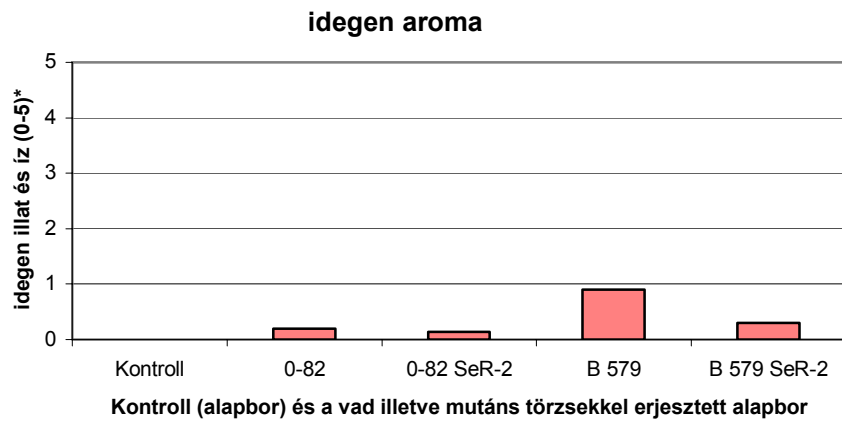
Az azonban bizonyított, hogy érzékszervileg is megnyilvánul a mutáns törzsek represszált kén-hidrogén termelése és a vad törzsekhez hasonló almasabontó képessége, és jelentős idegen aroma megjelenése nem jellemző.

A

*H₂S-es szag: 0 → 5

0: semmi nem érezhető
 5: nagyon erős, mindent elnyomó H₂S-es szag
 1,2,3,4: fokozatok 0 és 5 között

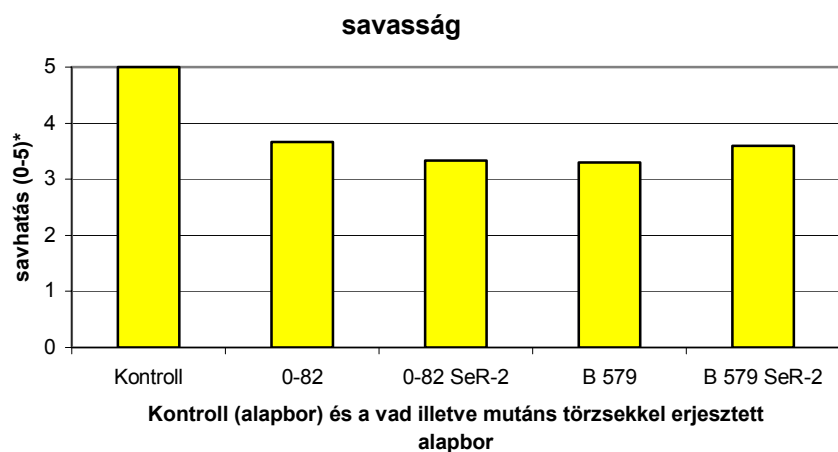
B



*idegen illat: 0 → 5

0: semmi nem érezhető
 5: nagyon erős, mindent elfedő idegen illat
 1,2,3,4: fokozatok 0 és 5 között

C



*Savasság: 0 → 5

0: egyáltalán nem savas
 5: nagyon savas (mint az alapbor)
 1,2,3,4: fokozatok 0 és 5 között

19. ábra Savas alapbor és a 0-82 ill. B 579 vad típusú törzsek és azok szelenát-rezisztens 0-82 Se^R-2 ill. B 579 Se^R-2 mutánsaival erjesztett borok érzékszervi összehasonlító vizsgálata

6. Eredmények értékelése, következtetések

6.1. Genotipizálási vizsgálatok

A 18 *Schiz. pombe* és 3 *Schiz. octosporus* törzs laboratóriumunkban korábban végzett, borászati szempontból fontos élettani tulajdonságainak vizsgálatát (almasavbontás, etanol tolerancia, H_2S -termelés) követően a törzsekkel genotipizálást végeztem RAPD-PCR technikával, 4-féle, 10 nukleotid hosszúságú random primert alkalmazva.

Ezután a *Schizosaccharomyces* nemzetséghez tartozó harmadik fajt reprezentáló további *Schiz. japonicus* törzseket is bevonva rDNS-RFLP analízist (ribotipizálás) végeztem.

A ribotipizálás során az rDNS NS1 és ITS4 primerekkel amplifikált szekvenciájának 4-féle restriktációs enzimmel való hasításával nyert "ujjlenyomatokat" hasonlítottam össze. Mivel mindkét eljárás független a gén expressziótól (Baleiras Couto, 1995), ezért kiválóan alkalmasak genotípusos jellemzésre. A DNS szerkezete állandó, a sejtek környezeti feltételei nem befolyásolják, szemben a hagyományos fenotípusos vizsgálatokkal vagy biokémiai tesztekkel.

A RAPD "ujjlenyomatok" és a vizsgált fenotípusos tulajdonságok összefüggéseit tekintve a következő következtetés vonható le:

(1) Almasavbontó képesség vizsgálata

- A legjobb almasavbontó törzsek RAPD mintázatuk alapján egyazon, a "RAPD-B"-nek nevezett csoportba tartoznak.
- Elkülöníthető egy közepes almasavbontó aktivitással rendelkező csoport is, melyek reprezentánsai főleg a "RAPD-A" és néhány a "RAPD-B" csoportokba tartoztak.
- A leggyengébb almasavbontó törzsek egyike sem sorolható a fenti RAPD-csoportokba, ezek RAPD-"ujjlenyomata" egyértelműen különbözik, a klaszteranalízis során más csoportokba kerültek.

(2) Szaporodás és etanol tolerancia vizsgálata

A szaporodás és etanol tolerancia tekintetében a *Schiz. octosporus* törzsek nagymértékben eltértek a többi törzstől, ahogyan a RAPD analízis során is egyértelmű külön csoportot alkottak ("RAPD-C"), azonban egyéb összefüggést nem állapítottunk meg. Mivel csupán 3 *Schiz. octosporus* törzs élettani vizsgálatát végezték és a genotipizálás során bebizonyosodott, hogy az egyik helytelenül lett identifikálva, a tulajdonképpen 2 törzs analízisével nem vonhatunk le általános következtetéseket a faj tulajdonságaira

vonatkozóan. Nem tudhatjuk biztonsággal, hogy az általunk vizsgált 2 törzs megfelelően reprezentálja-e a fajt, az azonban kimondható, hogy az S 702 és S 703 jelű *Schiz. octosporus* törzsek szaporodási rátája és etanol toleranciája a vizsgált összes *Schiz. pombe* törzssel összehasonlítva a leggyengébb (lásd 1 sz. melléklet, B ábra). A RAPD analízis alapján ez a 2 törzs áll legtávolabb az összes többitől (- a hasonlósági szint csupán kb. 30 %-ékos), ahogyan azt a dendogram (8. ábra) is mutatja.

(3) H₂S termelés

A RAPD "ujjlenyomatok" és ezen fenotípusos tulajdonság között semmilyen jellegzetes összefüggést nem találtunk. A H₂S termelés tekintetében nagy különbségek figyelhetők meg a különböző törzsek (izolátumok) között, de ezek a fenotípusbeli különbségek nem korreláltak a RAPD mintázatokkal.

A főkomponens analízis (PCA) és a RAPD-analízis korrelációját vizsgálva azt állapítottam meg, hogy az élettani tulajdonságokban mért jelentős különbségek a nagymértékben eltérő RAPD-mintázatban is megjelentek (pl. S 702 és S 703 elkülönülése; illetve a B 573, B 578, B579 és L. 975 csoport), de a finomabb eltérések esetén a korreláció nem volt teljesen egyértelmű. Egy-egy nagyobb RAPD-csoporton belül is (ahol a törzsek genomszintű hasonlósága akár 90 % körüli) voltak eltérő fenotípusos csoportba tartozó törzsek (pl. R 4-4-3, S 413, NY 315).

A ribotipizálás eredményei megerősítették, hogy az eljárás alkalmas a *Schizosaccharomyces* nemzetségen belüli fajok közti differenciálásra is a megfelelő restriktációs enzimek alkalmazásával, mint például a *HaeIII* és *Sau3AI*. A módszer kiválóan reprodukálható és viszonylag gyors volt: az eljárás optimalizálása után táplemezen való 1 napos tenyésztést követően 1 nap alatt elvégezhető. Az azonos fajhoz tartozó törzsek ugyanazokat a restriktációs mintázatokat mutatták mind a négy alkalmazott enzim esetében, fajon belüli eltéréseket nem figyeltem meg. A riboszómális DNS restriktációs analízise során nyert eredményeink megerősítik azt az álláspontot, hogy helyes a genusz törzseinek jelenleg elfogadott három fajba (*Schiz. pombe*, *Schiz. octosporus* és *Schiz. japonicus*) való besorolása (Bánszky és Maráz, 2000). Ezt DNS reasszociációs vizsgálatokkal (Vaughan-Martini, 1991), valamint ivaros hibridizációs kísérletekkel is demonstrálták, mivel a fajok közötti párosodás következetesen elmaradt (Johannsen, 1981, Sipiczki, 1982).

Úgy találtam továbbá, hogy a *Schiz. japonicus* törzsek ribotípusuk alapján nagyobb mértékben elkülönülnek a másik két fajtól, mint azok egymástól, mivel az *ScrFI* és *MspI* enzimekkel kapott restriktációs mintázat a *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* törzseknél megegyezett, ami

egy szorosabb rokonságot feltételezhet. Kurtzmann és Robnett (1991) a részleges riboszómális RNS szekvenciákat vizsgálták azok nukleotid eltérései alapján, amely során hasonlóan azt az eredményt kapták, hogy a *Schiz. japonicus* faj nagyobb mértékben különbözik a genusz másik két fájától. A különbségek azonban nem voltak olyan mértékűek, hogy igazolják a *Scizosaccharomyces* genusz felosztását és a fajok külön genuszba sorolását, amelynek lehetőségét más szerzők koenzim-Q-, alacsony hőmérsékletű citokróm spetrum-, zsírsav profil- és aszkospóra felületi morfológia-vizsgálatok alapján korábban felvetették (Yamada és Banno, 1987).

Az rRNS fragmentum kombinált – nagy (25S) és kis (18S) alegységének – részleges szekvencia analízisével (900 nukleotid) is megerősítést nyert, hogy a *Schiz. pombe* és a *Schiz. octosporus* fajok "közelebbi rokonságban" vannak egymással, mint a *Schiz. japonicus* fajjal (Kurtzmann, 1992). Érdekes, hogy korlátolt számban izoláltak a *Schiz. pombe* és az *Schiz. octosporus* fajok között protoplaszt fúzióval létrehozott prototróf hibrideket (Sipiczki, 1979), ugyanakkor leszögezhető, hogy a fúziós hibridek léte nem bizonyít konspecifitást. További érdekesség, hogy a *Schiz. japonicus* törzsek alacsony hőmérsékletű citokróm spetruma nagy mértékben különbözött az egymáshoz hasonló *Schiz. pombe* és az *Schiz. octosporus* fajokétól (Sipiczki et al., 1982).

A *Schiz. pombe* és a *Schiz. malidevorans* elkülönítésének jogosságát vizsgálataink sem a ribotipizálást, sem pedig a RAPD analízist tekintve nem erősítették meg. Eredményeink egybevágóak Vaughan-Martini (1991) DNS reasszociációs vizsgálataival, amelyekben az említett és korábban létezett alfajok típus-törzseinek genomját 98 %-ban azonosnak találták. A B 573, B 578 és B 579 jelű törzsek izogenikusnak mutatkoztak az elvégzett genotípus analízis során. Végül a genotipizálás során kiderült, hogy a korábban *Schiz. octosporus*-ként nyilvántartott S 413 jelű törzs a *Schiz. pombe* fajhoz tartozik.

6.2. Szulfát asszimilációban sérült szelenát-rezisztens mutánsok izolálása és analízise

Számos, a kén anyagcsere tekintetében vad típusú és egy metionin auxotróf, de nem szelenát rezisztens *Schiz. pombe* törzsből elsősorban UV indukcióval, de mutagén vegyületek bevetésével is sikeresen indukáltam és izoláltam szelenát-rezisztens mutáns törzseket. Az izolátumok rezisztencia mutációja stabil volt és a Na-szelenát M.I.C. érték 50-200-szorosát tolerálták. A szelenát a szulfát toxikus analógja, amelynek a sejtbe való bejutását a szulfát-permeáz(ok) segítik, ahol a szulfát redukciós anyagcsereút enzimes folyamatai toxikus

szelenitté redukálják (Gharieb et al., 1995). A szelenát toxicitását a redukciója során keletkező H_2O_2 és O_2^- megjelenésével magyarázzák (Pinson et al., 2000).

A rezisztencia kialakulása minden általam izolált *Schiz. pombe* mutáns esetében együtt járt a szulfát-hasznosítás képességének elvesztésével.

A kérdés a továbbiakban az volt, hogy a mutánsoknál észlelt fenotípusos változás hátterében a szulfát asszimilációs anyagcsereút milyen sérülése áll:

- azonos gént érintett-e valamennyi mutáns esetében, vagy pedig különböző gének sérültek; ezért megvizsgáltuk, hogy találunk-e a mutánsok között egymást komplementálókat,
- az anyagcsereút a szulfát transzport folyamatánál sérült, vagy pedig a transzport folyamatot követő redukciós lépések valamelyikénél, esetleg a szulfidnak a szerves vegyületekbe való beépülésénél.

Aspergillus nidulans és *Aspergillus niger* törzsek esetében a szelenát-rezisztens mutánsok, - amelyek szulfát hasznosítása szintén gátolt volt -, egy további kromát-rezisztencia vizsgálat alapján két komplementációs csoportba tartoztak aszerint, hogy a szulfát-permeáz, vagy a szulfát-reduktáz enzimkomplex működéséért felelős gének sérültek-e. (Buxton et al., 1989).

Az általam izolált *Schiz. pombe* mutánsok esetében nem kaptunk egyértelmű eredményt e tekintetben: a tápagarba adagolt kromát a M.I.C.-értékben is hosszú időn át gátolta az összes mutáns törzs növekedését, majd egy időben elhúzódó (kb. 2 hét után megfigyelhető) gyenge pázsitszerű növekedést tapasztaltam a táplemezek felületén. Ezen eredményeim szerint a szelenát rezisztens *Schiz. pombe* mutánsok között nem volt kromát-rezisztens izolátum, ez alapján tehát nem tudtam komplementációs csoportokba sorolni a törzseket.

A kapott eredmények a következő lehetőségekre engedtek következtetni:

1. az általam izolált mutánsok esetében a sérülés nem a szulfát-permeázt kódoló génben történt, vagy
2. a *Schiz. pombe* több kromát-permeázzal (szulfát-permeázzal) rendelkezik.

A komplementációs analízist az auxotrófia mutációkat is hordozó, egymással keresztezhető (egymás auxotrófiáját komplementáló) mutáns törzsek ivaros hibridizációjával folytattam. A vizsgálat eredményeképpen nem kaptam egymást komplementáló törzseket, ami arra utalt, hogy a vizsgált mutánsok a szulfát asszimilációs anyagcsereút azonos génjében sérültek.

A B579 $\text{Se}^{\text{R-2}}$ szelenát-rezisztens mutáns és a szelenát-rezisztencia (vagy szulfát hasznosítás) szempontjából vad AK 6/5 $\text{h}^- \text{ade6}^- \text{arg}^-$ törzs protoplaszt fúziójából származó hibridekkel végzett random spóraanalízis eredményeképpen közel 1:1 arányban kaptam rezisztens és

szenzitív klónokat, ami a szelenát-rezisztenciát tekintve egygénes mutációra utal (Bánszky és Maráz, 1997).

A mutánsok további vizsgálata során azok kénforrás analízisét végeztem el. A szerves kénforrások tekintetében a szelenát-rezisztens mutánsok tehát – ahogyan már tárgyaltuk – elveszítették azon képességüket, hogy a szulfát kéntartalmát megfelelő szerves kénvegyületeikbe beépítsék. Azonban a másik két szerves kénforrást, a tiosulfátot és a szulfitot továbbra is fel tudták használni. A vad törzsek számára a szerves kénforrások – mint szulfát, szulfit, tiosulfát – egységesen jól hasznosíthatók voltak. Mivel mutánsaink a szulfitot már a vad törzsekhez hasonló mértékben hasznosították, egyértelműen megállapítottuk, hogy a vizsgált törzsek esetében a szulfát-asszimilációs anyagcsereút sérülése a szulfát transzporttól a szulfitig tartó, több enzimes folyamatot magába foglaló redukciós útban van (Bánszky et al., 2003).

A szerves kénvegyületek közül a glutation és a cisztein mind a vad, mind pedig a rezisztens mutánsok számára megfelelő kénforrásnak bizonyult.

Az egyedüli kénforrásként rendelkezésre álló metioninon azonban a vad törzsek is igen lassan szaporodtak, a mutánsok pedig egyáltalán nem növekedtek (9. táblázat és 13. ábra). Eredményeinkre magyarázatot adnak Brzywczy és Paszewski (1994) azon vizsgálata, amelyekben a reverz transz-szulfurilációs anyagcsereút hiányát mutatják ki a *Schiz. pombe* fajnál. Eszerint a *Schiz. pombe*-ban metioninból közvetlenül nem keletkezhet cisztein két enzimmel katalizált lépésben a *S. cerevisiae*-hez hasonlóan, mert az ehhez szükséges két enzim – a cisztation β -szintáz és a cisztation γ -liáz – inaktív (Brzywczy és mtsi, 2002).

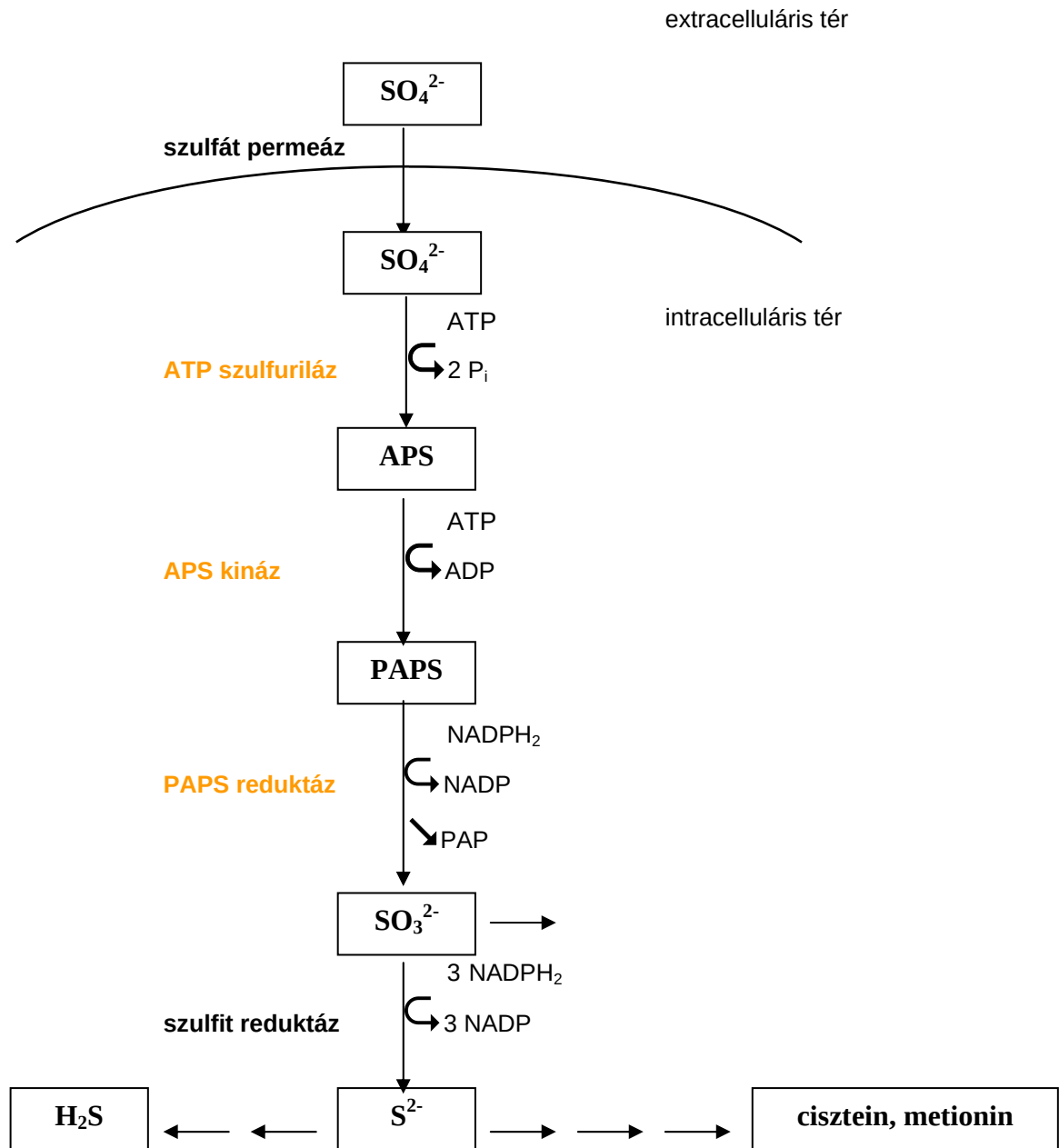
Mivel kísérleteimben a mutánsok egyáltalán nem tudták a metionint kénforrásként felhasználni, arra következtettünk, hogy a metionin kéntartalma a szulfát-asszimilációs anyagcsereúton keresztül épül be a *Schiz. pombe* szerves kén-vegyületeibe, amely a rezisztensek esetében nem működik, ezért nem képesek a szulfáthoz hasonlóan metioninon sem szaporodni. Valószínű, hogy a metionin először teljesen lebomlik, majd szulfid-csoportja (kén atomja) pedig szulfáttá oxidálódik, ahogyan azt *S. cerevisiae* esetében a glutationnál is kimutatták (Miyake et al., 1999). Az így keletkező szulfát az egyetlen kénforrás abban az esetben, amikor a táptalaj kénvegyületként csak metionint tartalmaz. Ezt a szulfátot azonban a szelenát-rezisztens mutáns sejtek nem képesek felhasználni.

További kísérleteim során ^{35}S -szulfát felvételét vizsgáltam 2-2 vad (B 579 és 0-82) és szelenát-rezisztens mutáns (B 579 Se^{R} -2 és 0-82 Se^{R} -2) törzs esetében. Azt tapasztaltam, hogy a mutáns törzseknél adott idő alatt a sejtbe jutó jelzett szulfát mennyisége ugyan határozottan

elmarad a vad törzsekéhez képest, azonban a transzport folyamat egyértelműen működik, mivel 60 perc elteltével – a megfelelő vad törzsekhez viszonyítva – 54, illetve 20%-os szulfát felvételt mértem. Mérési eredményeim alapján azt állapítottam meg, hogy nem a szulfát transzport folyamatok akadályozzák a szulfát hasznosulását, mert ha a szulfát-redukciós anyagcsere lépéseit katalizáló enzimek aktivitása a mutáció következtében nem változott, akkor a szelenát-rezisztens mutánsok csökkent mértékű szulfát felvétele nem lehetne akadálya a szulfáton való növekedésnek, különösképpen például egy olyan mutáns esetében, mint a B 579 Se^R-2, amely a vad törzs által felvett szulfát mennyiség 54%-át képes volt felvenni.

Eredményeim szerint azonban a mutáns törzsek egyike sem volt képes egyedüli kénforrásként a szulfátot hasznosítani, ezért arra kell következtetnünk, hogy a csökkent szulfát felvétel nem a szulfát-permeáz gén "leaky" mutációjának tulajdonítható, vagy esetlegesen a *Schiz. pombe*-ban is jelenlévő több szulfát-permeáz egyikének az inaktivációja miatt tapasztalható. Sokkal valószínűbbnek tűnik, hogy a mutáció következtében a sejten belül a szulfát aktiválásáért felelős ATP-szulfuriláz, a keletkező APS foszforilálásáért felelős APS-kináz vagy a keletkező PAPS redukciójáért felelős PAPS-reduktáz enzimet kódoló gén inaktiválódott (20. ábra) (Bánszky et al., 2003). Az anyagcsereút további enzimei megfelelően működnek, ahogyan azt a szulfít hasznosítás vizsgálatának eredményei mutatták. A szulfítig tartó redukció elmaradása következtében a szulfát az intracelluláris térben felhalmozódik és gátolja a további transzport folyamatot, mint ahogyan azt a *S. cerevisiae* esetében is tapasztalták (Logan és tsai, 1996).

A B 579 Se^R-2 szelenát rezisztens mutáns törzs erős szelén akkumulációja is azt bizonyítja (16. ábra), hogy a mutáció következtében nem a transzport folyamatok, hanem az intracelluláris szulfát-redukció sérült (Raspor et al., 2003).



Rövidítések. APS: 5'-adenylyl szulfát; PAPS: 3'-foszfo-5'-adenylylszulfát

20. ábra A szelenát rezisztens *Schiz. pombe* mutánsok szulfát asszimilációs anyagcsereútjában lehetséges sérült enzimek

6.3. Szelenát-rezisztens és vad típusú *Schiz. pombe* törzsek kén-hidrogén termelésének, erjedési aromaszpektrumának és almasavbontásának összehasonlítása mikrovínifikációs körülmények között

Munkám következő fázisában az izolált és analizált mutánsok borászati szempontból fontos fenotípusos tulajdonságait teszteltük és hasonlítottuk a megfelelő vad törzsekhez, hogy meghatározzuk, az előidézett mutáció mennyiben befolyásolja a törzsek

- (1) H_2S -termelését, amelynek csökkentését határoztuk meg törzsfejlesztési munkánk céljául,
- (2) korábbi jó almasavbontó képességét, amelyet szeretnénk megtartani a törzsfejlesztés során,
- (3) erjedési aromaszpektrumát.

Az erjedési aromaszpektrumot két vad típusú *Schiz. pombe* (L. 972 és B 579), valamint a B 579 $\text{Se}^{\text{R}}-2$ mutáns törzsnél vettük fel. A törzsfejlesztési munka során korábban ilyen jellemzőket nem vizsgáltunk, ezért hasonlítottunk össze 2 vad törzset is, hogy látni lehessen, mennyire szórnak ezek az eredmények egy faj két különböző helyről származó reprezentánusa között.

Érzékszervi vizsgálatokkal teszteltük a vad (0-82 illetve B 579), illetve szelenát-rezisztens mutáns (0-82 $\text{Se}^{\text{R}}-2$ illetve B 579 $\text{Se}^{\text{R}}-2$) törzseket további mikrovínifikációs kísérletekben, ahol az almasavbontást követően a borminták savasságát, H_2S -es szagát és egyéb vegyületek által esetlegesen kialakuló idegen illatát értékeltük.

(1) Kén-hidrogén-termelés vizsgálata

Azonos tenyésztési feltételek mellett a vad törzsek között is nagy a szórás figyelhető meg a H_2S -termelés tekintetében, amely ezen tulajdonság nagy variabilitására utal a fajon belül.

Az ólom-acetátos szemikvantitatív módszerrel számos törzs H_2S -termelését teszteltem és hasonlítottam össze mesterséges táplevesekben. A módszer megfelelő volt a törzsek H_2S -termelésre való hajlamának szűrésére és a törzsek összehasonlítására, de nem alkalmas pontos mérésre. A szűrési vizsgálatban kaptam nagyon erős kén-hidrogén termelő törzset (pl. R 4-1-1 törzs), közepes mennyiségben kén-hidrogént termelő törzseket (pl. L. 972 és L. 975) és gyenge kén-hidrogén termelőket (pl. B 579). A vizsgálatba bevont vad típusú törzseknek megfelelő szelenát-rezisztens mutánsok H_2S termelése szervesen kénforrásokon nem volt detektálható, de ciszetinnel kiegészített táplevesben ezeknél is megfigyeltem kis mennyiségű kén-hidrogén termelést.

Egy, a törzsek által termelt H_2S meghatározására alkalmas fotometriás módszert (4.3.18.) adaptáltunk (Jiranek et al., 1995) és optimalizáltunk a pontos kvantitatív mérésekhez. Az L. 972 és a 0-82 vad típusú törzsek 1,5-4-szer annyi kén-hidrogént termeltek YEPD táplevesben, mint a B 579 törzs. Must erjesztése során az L. 972 törzs 2-5-ször annyi kén-hidrogént termelt, mint a B 579.

A 0-82 és B 579 jelű vad törzseknek megfelelő rezisztens mutánsok (0-82 $\text{Se}^{\text{R}}-2$ és B 579 $\text{Se}^{\text{R}}-2$) nem termeltek detektálható mennyiségű kén-hidrogént, a mutánsok tehát ilyen szempontból előnyösek lennének a borászatban való alkalmazásra.

(2) Almasavbontás vizsgálata vad és szelenát-rezisztens mutáns törzseknel

Komplett (YEPD) táplevesben és kétféle borban mértem a 0-82 és B 579 jelű vad törzsek, illetve azok szelenát-rezisztens mutáns "párjainak" (0-82 $\text{Se}^{\text{R}}-2$ és B 579 $\text{Se}^{\text{R}}-2$) az almasavbontását. Az összes vizsgált törzs bontotta az almasavat, de a borokban kisebb mértékben, mint komplett táplevesben. Borban a maradék almasav tartalom 30-70 % között mozgott. A mutánsok almasavbontása nagyon hasonló mértékű volt a megfelelő vad törzsekéhez. Megállapítottuk tehát, hogy a mutáció következtében inaktiválódott anyagcserefolyamat (- a szulfát redukció elmaradása -) nem befolyásolja az almasavbontó képességet, és egyben arra is utal, hogy a szulfát nem elengedhetetlen kénforrás a *Schiz. pombe* borban történő szaporodásához, illetve metabolismusához..

(3) Aromaspektrum felvétele vad és mutáns törzsekkel erjesztett must és táptalaj fermentációja után

A B579 $\text{Se}^{\text{R}}-2$ mutáns és a B 579 illetve L. 972 vad törzsek általános aromaspektrumát hasonlítottuk össze, melynek során azt tapasztaltam, hogy a legtöbb azonosított aromavegyület mennyiségének tekintetében nincs szignifikáns eltérés a rezisztens mutánsal, illetve a vad törzsekkel erjesztett must és táptalaj minták között.

A B 579 és B 579 $\text{Se}^{\text{R}}-2$ törzsekkel erjesztett mustok esetében a t-próba szignifikáns különbséget mutatott bizonyos etil-észterek (etil-oktanoát, etil-9-decenoát, és etil-dodekanoát) mennyiségében. Ezek a vegyületek a borok másodlagos aromaanyagainak fontos csoportjába tartoznak (Lambrechts és Pretorius, 2000), tehát érdemes lenne még vizsgálni, hogy érzékszervi hatásban megnyilvánulnak-e ezek a mennyiségbeli eltérések.

Ebben a kísérlet sorozatban erre közvetlenül nem került sor, azonban további munkám során érzékszervi vizsgálatokat végeztünk borokkal vad típusú, illetve a mutáns *Schiz. pombe* törzsekkel végzett fermentációt követően.

A 2-2 vad (0-82 illetve B 579) és szelenát-rezisztens (0-82 Se^R-2 illetve B 579 Se^R-2) törzsborban történő almasavbontását követően a borminták savassága érzékszervileg detektálható mértékben csökkent, de az eredendően savas borok erős savassága teljesen nem tűnt el. A mutáns törzsekkel kezelt borok esetében H₂S-es szagot nem detektáltak a kóstolók, azonban a vad törzseknél is csak nagyon kismértékű kénhidrogénes jelleget figyeltek meg, sőt a B 579-es törzs esetében az 5 vizsgáló közül csupán egy jelzett kismértékben érezhető, kellemetlen kénhidrogénes szagot.

A borok idegen aromáját tekintve, nagyon enyhe eltérést tapasztaltak a kezeletlen borhoz képest, amelyben azonban sem az almasavat nem bontották le, se semmilyen további fermentációnak, vagy kezelésnek nem vetették alá.

Összeségében megállapítottam tehát, hogy a vizsgált mutánsok borászati szempontból számunkra fontos tulajdonságai nem romlottak a mutáció következtében: almasavbontó aktivitásuk közel hasonló a megfelelő vad típusú törzsekéhez, és nem termelnek a vad törzsektől nagymértékben eltérő, a borok aromáját negatív irányba befolyásoló idegen aromákat.

Nagyon jelentős eredménynek tekintjük, hogy a *Schiz. pombe* fajra jellemző erős kénhidrogén termelést azonban az előidézett mutációval jelentős mértékben csökkenteni tudtuk.

7. Új tudományos eredmények

7.1. Új tudományos eredmények

- (1) A PCR alapú molekuláris genotipizálással megállapítottam, hogy a *Schiz. pombe* fajon belül különböző RAPD-csoportok (klaszterek) határolódnak el egymástól, amelyek a törzsek bizonyos fenotípusos tulajdonságaival (pl. almasavbontási képesség) korrelálnak. Az *Schiz. octosporus* törzsek fenotípusos tulajdonságaikban megnyilvánuló eltéréseiknek megfelelően a RAPD-PCR analízis alapján is nagyon kismértékű hasonlóságot (30%) mutatnak a *Schiz. pombe* törzsekkel.
- (2) Az rDNS RFLP-n alapuló molekuláris identifikálással a *Schizosaccharomyces* nemzetség jelenleg elfogadott mindhárom faja identifikálható, de az általam alkalmazott vizsgálat fajon belül a törzsek között nem mutatott ki különbségeket. A restriktációs hasítóhelyek összehasonlítása alapján a *Schiz. pombe* és a *Schiz. octosporus* fajok genetikailag közelebb állnak egymáshoz, mint a *Schiz. japonicus* fajhoz.
- (3) Sikeresen indukáltam és izoláltam 117 szelenát rezisztens mutáns törzset 13 szelenát-szenzitív - a szulfát hasznosítás szempontjából vad típusú - *Schiz. pombe* törzsből. A mutáció stabil volt és a mutánsok a 0,1-0,2 mM nátrium-szelenát M.I.C. érték 50-200-szorosát tolerálták.
- (4) Megállapítottam, hogy az izolált mutánsok egy genetikai komplementációs csoportba tartoznak, a szulfát transzportjára képesek és a mutáció a szulfát asszimilációs anyagcsereútban az ATP-szulfuriláz, az APS-kináz, vagy a PAPS-reduktáz enzimeket kódoló gének valamelyikében történt.
- (5) A szelenát rezisztens mutáns törzsek különböző szerves és szervetlen kénforrások közül a szulfátot és metionint nem képesek hasznosítani. *Schiz. pombe*-ban kimutattam, hogy a metionin kénatomjának beépülése más szerves vegyületekbe a szulfát redukcióhoz kötött.
- (6) A B579 Se^R-2 és a 0-82 Se^R-2 mutáns törzsek kén-hidrogén termelése analitikai vizsgálatokban nem volt detektálható, ugyanakkor jó almasavbontó képességük és erjedési aromaszpektrumuk nem változott a vad törzsekéhez képest. Az említett mutánsokkal végzett malo-etanolos fermentáció után a kezelt borok organoleptikus vizsgálatával megállapítottuk, hogy a mutánsok a bor savasságát csökkentették, míg kellemetlen mennyiségű idegen aromát és kén-hidrogént nem termeltek.

7.2. Az eredmények hasznosítási és továbbfejlesztési lehetőségei

- A *Schizosaccharomyces pombe* kén anyagcseréjének kutatása szempontjából az izolált szelenát rezisztens mutánsok további vizsgálatát, a mutáció pontos helyének meghatározását javasolnám. A mutánsok *Schiz. pombe* génbankkal való transzformálása és a sérült gén klónozása illetve jellemzése közelebb vinne a szulfát redukciós út jellemzőinek megismeréséhez.
- A *Schiz. pombe* fajnál a transzszulfurilációs anyagcsereút két enzimének hiányában nincs lehetőség a metionin közvetlen ciszteinné alakulására. A megfelelő anyagcsere további kutatása egy pontosabb képet adna a metionin metabolikus útjáról *Schiz. pombe*-ban.
- A tesztelt szelenát rezisztens mutánsok nem termeltek detektálható mennyiségű kénhidrogént és jól bontották az almasavat, ezért azok a borászatban biológiai almasavbontásra alkalmazhatók lennének.
- A borászati alkalmazáshoz megfelelő üzemi technológia kidolgozása válik szükségessé. A megoldandó problémát elsősorban a hatékony almasavbontáshoz elegendő sejttömeg elszaporítása, illetve a sejtek fermentációt követő gyors és költségkímélő eltávolítása jelenti a közegből. E probléma megoldására a korábban izolált flokkulens *Schiz. pombe* törzsek és a jó almasavbontó aktivitással rendelkező, káros kéntartalmú aromavegyületeket nem termelő szelenát rezisztens mutánsok előnyös tulajdonságainak kombinálását javaslom megvizsgálni például az említett törzsek keresztezésével.

8. Összefoglalás

Régóta ismeretes, hogy a *Schizosaccharomyces* nemzetség bizonyos fajai nagy hatékonysággal bontják az almasavat a malo-etanolos fermentációs úton. A *Schizosaccharomyces pombe* malo-etanolos fermentációja (MEF) a számos nehézséget magában hordozó tejsavbaktériumos malo-laktikus fermentáció (MLF) alternatívája lehetne a biológiai almasavbontásban. Számos tanulmány foglalkozott a *Schiz. pombe* borászati technológiai alkalmazásának lehetőségével, de alkalmazása még erősen vitatott. A fermentációs folyamat legnagyobb hátránya a vizsgált törzsek által termelt kellemetlen aromák, köztük H_2S és egyéb kéntartalmú illékony vegyületek (pl. merkaptánok, diszulfidok) megjelenése.

Ez a dolgozat egy olyan törzsjavítási program része, amelynek végső célkitűzése volt, hogy a borászat számára optimális tulajdonságokkal bíró élesztőtörzset fejlesszünk, amely kiváló almasavbontó aktivitással, csökkent szulfid (kénhidrogén) termelő képességgel, valamint jó flokkulációs tulajdonságokkal rendelkezik. Kutatócsoportunkban Geleta Anna (1996) *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* izolátumok között nagy fenotípusos eltéréseket talált, ezeket a törzseket az etanol tolerancia, almasavbontás és kénhidrogén termelés alapján csoportosította, majd jó almasavbontó aktivitással rendelkező flokkulens törzset fejlesztett, amely borban a 12%-os etanol koncentrációt tolerálta, azonban a törzs kénhidrogén termelését nem szabályozták.

A fermentáció során a törzsek által termelt kénhidrogén- és a kéntartalmú kénhidrogén-származékok mennyiségét több tényező is befolyásolja (pl. nitrogén ellátottság és egyebek), de elsősorban az alkalmazott élesztőtörzs kén metabolizmusának genetikai jellemzői, a törzs genetikai hajlama.

Annak ellenére, hogy a *Schiz. pombe* fiziológiájáról és genetikájáról sokat tudunk, kén metabolizmusa még nem tisztázott. A szulfát metabolizmust *Saccharomyces cerevisiae*-nél, valamint néhány fonalas gomba fajnál, mint a *Neurospora crassa* és *Aspergillus nidulans*, már behatóan tanulmányozták.

A szulfát, amely sok szervezet számára a legfontosabb kénforrás, specifikus transzport rendszer segítségével jut a sejtbe. A sejten belüli akkumulációt követően a szulfát asszimilációs anyagcsereúton enzimatis reakciókkal szulfiddá redukálódik majd beépül a szerves vegyületekbe. Az élesztőgombában a szulfát asszimilációs anyagcsereút a szulfát anion két lépésben történő aktiválásával kezdődik: először az ATP adenosin-foszforil gyöke a

szulfáthoz kapcsolódik és adenilil szulfát keletkezik (APS = 5'-adenozin-foszfo-szulfát), amely azután foszforilálódik és foszfoadenilil szulfát (PAPS = 3'-foszfo-adenozin-5'-foszfoszulfát) keletkezik. A két lépést sorra az ATP szulfuriláz és az APS kináz enzimek katalizálják. A cisztein és metionin bioszintéziséhez az aktivált szulfát először a PAPS reduktáz enzim hatására szulfittá redukálódik, amely azután a szulfít reduktáz segítségével tovább redukálódik szulfiddá. A folyamat végén a redukált kénatom képes beépülni a megfelelő szénláncokba.

A *S. cerevisiae* és az *Asp. nidulans* gombákkal ellentétben a *Schiz. pombe* élesztőben két enzim – a cisztationin β -szintáz és a cisztationin γ -liáz – aktivitása hiányzik a metionintól a cisztein felé vezető reverz transzszulfurilációs anyagcsereútban (Brzywczy and Paszewski, 2002). Ennek következtében a *Schiz. pombe* a metionint közvetlenül nem metabolizálja ciszteinné, így a metionin nem egy hatékony kénforrás e gombafaj számára.

A szelenát a szulfát toxikus analógja, sejbe való transzportja és metabolizmusa a szulfát anyagcseréhez kötődik. Arst (1968) azt találta, hogy bizonyos szulfátot nem hasznosító *Asp. nidulans* mutánsok párhuzamosan erős szelenát rezisztenciával jellemezhetők. Ezek a mutánsok két genetikai komplementációs csoportba tertoztak: *sB* és *sC*. Az *sB* gén a szulfát permeáz, az *sC* pedig az ATP szulfuriláz enzimet kódolja. Az *sB* mutánsok kromát rezisztens fenotípusúak, míg az *sC* mutánsok a kromáttal szemben ugyanolyan érzékenységek voltak, mint a vad típusú sejtek. A PAPS reduktáz enzimben sérült mutánsok kisebb mértékű szelenát toleranciát mutattak, az APS kináz sérülése pedig szelenát hiperszenzitivitással járt együtt. Breton and Surdin-Kerjan (1977) szelenát- és kromát rezisztens *S. cerevisiae* mutánsokat izoláltak és tanulmányoztak. A szulfát redukciós anyagcsereútban szereplő első három enzim bármelyikének mutációja szelenát rezisztenciát okozott, de az ATP szulfurilázban sérült mutánsok 20-50-szer magasabb szelenát koncentrációt toleráltak, mint az APS kináz vagy PAPS reduktáz aktivitásában gátolt mutánsok.

Dolgozatom főbb célkitűzései a következők voltak:

- *Schizosaccharomyces* nemzetséghez tartozó élesztő izolátumok molekuláris jellemzése RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphic DNA) és rDNS RFLP ("ribotipizálás" / Restriction Fragment Length Polymorphism of Amplified rDNA sequences) analízis segítségével, valamint annak vizsgálata, hogy a törzsek Geleta (1996) által korábban tanulmányozott élettani jellemzői (almasav-bontás, szaporodási ráta, H₂S-termelés) mennyiben korrelálnak a molekuláris "ujjlenyomatok" eredményeivel

- a szulfát metabolizmus vizsgálata *Schiz. pombe*-ban a szulfát asszimilációs anyagcsereútban sérült szelenát rezisztens mutánsok indukciója, izolálása és analízise által
- H₂S-t nem termelő, megfelelő almasavbontó aktivitással rendelkező *Schiz. pombe* törzs szelektálása borászati alkalmazás céljára

Az alábbiakban tárgyalta tekintem új tudományos eredményeknek.

A különböző fenotípusos tulajdonságokkal bíró *Schiz. pombe* és *Schiz. octosporus* törzsek klaszter analízisét végeztem el a RAPD-PCR analízis alapján szerkesztett dendrogram segítségével és bizonyos korrelációt találtam a törzsek almasavbontó képessége illetve a RAPD "ujjlenyomatok" között. Az rDNS RFLP analízise alkalmas volt a *Schizosaccharomyces* genuszon belüli fajok elkülönítésére, de fajon belüli különbségeket nem mutatott ki.

Elsőként izoláltam számos stabil szelenát rezisztens *Schiz. pombe* mutáns törzset a vad sejtek mutagén kezelésével (UV besugárzás, EMS- és MNNG-kezelés), az izolált mutánsok kivétel nélkül nem képesek a szulfátot hasznosítani és ugyanabba a genetikai komplementációs csoportba tartoznak. A mutáció nem volt hatással a törzsek kromát érzékenységére.

A szelenát rezisztens mutánsok szulfát felvétele gyenge volt. Bebizonyítottam, hogy a mutánsok gátolt szulfát akkumulációja egy csökkent mértékű intracelluláris akkumuláció következménye, ami egyben permeáz által irányított transzport létezésére utal a *Schiz. pombe* esetében. Amennyiben a szulfát szulfittá való redukcióját katalizáló enzimek aktivitása nem változik, a csökkent mértékű szulfát felvétel nem lehetne gátja a növekedésnek szulfát tartalmú táptalajon, ezért arra következtettem, hogy a mutáció során a szulfát aktiválásáért (ATP szulfuriláz), foszforilálásáért (APS kináz), vagy redukálásáért (PAPS reduktáz) felelős enzimek valamelyike inaktiválódott. A mutánsok vad típusú sejtekhez hasonló mértékű szulfát felvételét a blokkolt redukciós anyagcsereút következtében intracellulárisan felhalmozódott szulfát gátolja, ezzel magyarázható a mutánsok gyengébb szulfát felvétele.

A mutánsok egyedüli kénforrásként szulfít, tioszulfát, cisztein vagy glutation tartalmú táptalajon szaporodnak, de nem képesek növekedni szulfát vagy metionin jelenlétében, míg a vad típusú sejtek az összes említett szerves és szervetlen kénforrást hasznosítják.

Annak ellenére, hogy a *Schiz. pombe*-ban hiányzik a reverz transzszulfurilációs anyagcsereút, a metioninon képesek voltak növekedni a vad típusú sejtek. A szelenát rezisztens mutánsok elvesztették metionin hasznosítási képességüket, ezzel azt jelezve, hogy a metionin

kénatomjának szerves vegyületekbe való beépülése elsősorban a szulfát asszimilációs anyagcsereúton keresztül történik. Nagyon valószínű, hogy a metionin S^{2-} csoportja a *Schiz. pombe*-ban egy degradációs úton szulfáttá oxidálódik. Ez a szulfát "készlet" az egyedüli kénforrás abban az esetben, amikor kénforrásként csak metionin áll a sejtek rendelkezésére. A szelenát rezisztens törzsek metionin hasznosításának gátja a szulfát redukciós anyagcsereút blokkolása.

A mutánsok borászati szempontból fontos tulajdonságait tekintve kimutattam, hogy a vizsgált szelenát rezisztens törzsek (B 579 Se^R -2 és 0-82 Se^R -2) H_2S termelése nem detektálható, míg a szelenát szenzitív vad típusú sejtek nagy mennyiségű szulfidot termeltek komplett táplevesben, mustban és borban. A mutánsok almasavbontó képessége nem változott és a fermentációs aroma spektrumuk is hasonló volt a vad törzsekéhez. Ez azt jelenti, hogy a mutáció pozitív hatással volt a *Schiz. pombe* törzsek kellemetlen kéntartalmú aroma termelésére, míg az almasavbontási rátát és a fermentációs aromaprofilt nem befolyásolta hátrányosan.

A eredmények alapján megállapítottam, hogy a tesztelt szelenát rezisztens mutáns törzsek alkalmazhatóak lennének biológiai almasavbontásra, mivel az almasavat jól bontották mustban és borban, valamint nem termeltek sem műszeres méréssel, sem pedig érzékszervi minősítéssel detektálható mennyiségű kénhidrogént.

Az eredmények fejlesztése tekintetében a mutánsoknál érdemes lenne a sérült gént azonosítani, a mutáció pontos helyét meghatározni.

A malo-etanolos savcsökkentés technológiai műveletének szempontjából elsősorban a szükséges sejttömeg megfelelő felszaporításának kivitelezése, valamint az almasavbontást követően a sejtek fermentációs közegből való gyors és költségghatékony eltávolítása vizsgálendő. Utóbbi szempontból érdemes lenne tesztelni a mutáns sejtek immobilizálásának lehetőségét, vagy költségcsökkentés céljából a *Schiz. pombe* flokkulációs tulajdonságát kihasználni. Ajánlatos lenne borászati célra egy megfelelő ipari törzs fejlesztése szelenát-rezisztens (kénhidrogént nem termelő), jó almasavbontó törzs illetve flokkulens törzs keresztezésével.

9. Summary

It has long been known that certain strains of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* are able to metabolize high amount of L-malic acid via the malo-ethanolic fermentation pathway. Malo-ethanolic fermentation (MEF) by *Schiz. pombe* could serve as an alternative method for biological deacidification of must or wine instead of the malo-lactic fermentation (MLF) carried out with lactic acid bacteria, which process has several difficulties. Numerous studies were performed on *Schiz. pombe* from technological aspects, but its applicability to vinification has been found controversial. The main disadvantage of the fermentation process is that many of the tested strains were found to produce off-flavours, including H₂S and other sulphur containing flavours (mercaptans and disulphides).

This study is a part of a breeding program aiming to improve a suitable strain for enological purposes, to achieve a yeast strain with high malic acid fermentation rate, reduced or eliminated sulfid (H₂S) formation capability and excellent flocculation properties. In our research team Geleta (1996) has found different groups of *Schiz. pombe* and *Schiz. octosporus* strains with highly variable phenotypic characters on the basis of following physiological features as ethanol tolerance, malic acid degradation rate and H₂S production of the isolates, furthermore developed a flocculent strain which tolerated 12% of ethanol content in wine and metabolized considerable amount of malic acid but H₂S formation property of this strain has not been controled.

The amount of off-flavours as H₂S and its sulphur-containing derivates produced by the strains during fermentation is influenced by several factors (such as nitrogen supply and others) but mostly by the genetic characteristic – genetic determination of sulphur metabolism – of the yeast strain applied.

Although much is known about physiology and genetics of *Schiz. pombe*, its sulphur metabolism is unclear. Sulphate metabolism has been well studied in yeast *Saccharomyces cerevisiae* and in certain filamentous fungi, such as *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans*.

Sulphate, the major sulphur source in many organism, transported into cells by specific membrane transport systems. After accumulation sulphate is enzymatically reduced to sulphide by the sulphate assimilation pathway and than incorporated into organic compounds. In yeast the sulphate assimilation pathway begins with the activation of sulphate anions in two sequential reactions: the first transfers the adenosyl-phosphoryl moiety of ATP to

sulphate, yielding adenylyl sulphate (APS = 5'-adenosin-phospho-sulphate), which is in turn phosphorylated to yield phosphoadenylyl sulphate (PAPS = 3'-phospho-adenosin-5'-phospho-sulphate). The enzymes catalysing these two reactions are ATP sulphurylase and APS kinase, respectively. For cysteine and methionine biosynthesis, activated sulphate is sequentially reduced by PAPS reductase to sulphite which is in turn further reduced to sulphide by sulphite reductase. At the end of this process, the reduced sulphur atom can be incorporated into carbon chains.

Schiz. pombe, in contrast to *S. cerevisiae* and *Asp. nidulans*, lacks cystathionine β -synthase and cystathionine γ -lyase, two enzymes of the reverse transsulphuration pathway from methionine to cysteine (Brzywczy and Paszewski, 2002). This suggest that *Schiz. pombe* is not able to metabolize methionine efficiently to cysteine and as a consequence, methionine can not serve as an efficient sulphur source for this fungus.

Selenate is a toxic analogue of sulphate, its transport into the cell and its metabolism connected to the sulphate pathway. Arst (1968) found that certain sulphate-non-utilizing mutants of *Asp. nidulans* showed strong resistance to selenate simultaneously. These mutants belonged to two genetic complementation groups: *sB* and *sC*. *sB* gene was coding for sulphate permease and *sC* gene for ATP sulphurylase enzymes. *sB*⁻ mutants have also gained chromate resistant phenotype, while *sC*⁻ mutants retained the same degree of sensitivity as the wild type. PAPS reductase deficient mutants had only a weak selenate tolerance, while deficiency in APS kinase caused hypersensitivity to selenate. Selenate- and chromate resistant mutants of *S. cerevisiae* were also isolated and studied by Breton and Surdin-Kerjan (1977). Mutation in any of the first three genes of the sulphate reduction pathway resulted in resistance to selenate, but ATP sulphurylase deficient mutants tolerated 20-50 times more selenate than the mutants lacking APS kinase or PAPS reductase activity.

The main goals of this study were to

- characterise the yeast strain isolates belonging to the *Schizosaccharomyces* genus by molecular typing methods such as Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD-PCR) analysis and Restriction Fragment Length Polymorphism of Amplified rDNA sequences (RFLP of rDNA / "ribotyping") to answer the question which correlation could be found between these genotypic fingerprints and the phenotypic characters investigated by Geleta (1996) before (growth rate, malic acid degradation rate and H₂S production)

- investigate sulphur metabolism in *Schiz. pombe* by inducing, isolating and analysing selenate resistant mutants defective in any steps of the sulphate assimilation pathway,
- selecting non-H₂S-forming *Schiz. pombe* strain with adequate malic acid fermentation rate for enological purposes

The following could be considered as new scientific results.

Schiz. pombe and *Schiz. octosporus* strains with different phenotypic characters have been clustering by dendogram based on RAPD-PCR fingerprints and correlation has been found between RAPD clusters and the character of malic acid degradation ability of the strains. The RFLP analysis of rDNA were applicable for species identification within the genus *Schizosaccharomyces* but showed no differences within the species.

Numerous stabil, selenate resistant *Schiz. pombe* mutants have been isolated for the first time after mutagenic treatments as UV irradiation, EMS- and MNNG treatments of the cells. All the mutants isolated in our laboratory have sulphate-non-utilizing character and they belong to the same genetic complementation group. Selenate resistance of the mutants did not influence their sensitivity to chromate.

Selenate resistant mutants were low in sulphate uptake activity and the decreased sulphate accumulation of the mutants was proved to be the consequence of a decreased intracellular accumulation in mutants which indicates the existence of a permease-mediated transport in *Schiz. pombe*. As the limited decrease of sulphate uptake by the selenate resistant mutants had to allow considerable growth on sulphate containing medium, provided that the activities of enzymes catalyzing the reduction of sulphate to sulphide did not change we concluded that the mutation inactivated one of the genes encoding for the sulphate activation (ATP sulphurylase), phosphorylation (APS kinase) or reduction (PAPS reductase). The low sulphate uptake of the mutants could be attributed to the intracellularly accumulated sulphate - as a consequence of lacking sulphate reduction pathway - which limited the further transport of sulphate.

Mutants grew on medium containing sulphite, thiosulphate, cysteine or glutathione but did not grow on medium containing sulphate or methionine as sole sulphur source while wild type strains were able to propagate on all mentioned organic and inorganic sulphur sources.

We showed that methionine is able to support growth of wild type *Schiz. pombe* strains, although reverse transsulphurilation pathway does not exist in this organism. All the selenate resistant mutants lost the ability to utilize methionine indicating that the main route for

incorporation of the sulphur atom from methionine is the sulphate assimilation pathway. It is highly probable that S^{2-} group of methionine is oxidized to sulphate via a degradation route in *Schiz. pombe*. This sulphate pool is the only sulphur source when methionine is the sulphur supply alone for the cells. Inability of the selenate resistant mutants to utilize methionine is the consequence of the lacking sulphate reduction pathway to sulphite.

Regarding the enologically important properties of selenate resistant mutant strains we showed that H_2S formation of the tested selenate resistant strains (B 579 Se^R -2 and 0-82 Se^R -2) were not detectable while selenate sensitive wild type cells produced excess sulphide (H_2S) in artificial culture media, must and wine. Malic acid degradation ability remained the same in the mutant strains and fermentation aroma spectrum of mutants were similar to wild type strains as well. It means that the mutation in sulphate assimilation pathway had a positive effect on the sulphur containing off-flavour production of *Schiz. pombe* strains while malic acid consumption rate and fermentation aroma profile were not affected disadvantageously by the mutation.

On the basis of these results I concluded that the tested selenate resistant mutant strains would be applicable in biological malic acid degradation. H_2S production of the mutant strains investigated both by analytical and organoleptical procedures was not detectable and mutant strains proved to metabolize malic acid efficiently in must and wine as well.

For further development of the results would be worth identifying the inactivated gene, determining the exact locus of the mutation.

Regarding malo-ethanolic deacidification process from technological aspect is the following to study above all: the growing up of required cell mass, as well as quick and costeffective remove of cells from the fermentation media after deacidification has been completed. In this respect it is recommended to test the applicability of immobilized cells, or for lowering costs using up flocculation property of *Schiz. pombe*. It is highly recommended to improve a suitable strain for commercial wine production by crossing selenate resistant (non- H_2S -forming), good malic acid degrading mutants with flocculent *Schiz. pombe* strains.

Irodalomjegyzék

- Acree, T. E., Sonoff, E. P. and Splittstoesser, D. F. (1972) Effect of yeast strains and type of sulphur compounds on hydrogen sulphide production. *Am. J. Enol. Vitic.*, **23**, 1, 6-9
- Arst H. N. (1968) Genetic analysis of the first step of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Nature* **219**, 268-270
- Auriol, P., Tulasi, S., Goma, G., and Strehaiano, P. (1987) Deacidification par *Schizosaccharomyces*. Etude sur les aptitudes de differentes souches. Approche cinetique sur la degradation de l'acide malique. *Rev. Fr. Oenol.*, **108**, 37-42
- Baleiras Couto, M. M., Vogels, J. T., Hofstra, H., Huis in't Veld, J. H. J. and van der Vossen, J.M.B.M. (1995) Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-borne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 525-535
- Baleiras Couto, M.M., van der Vossen, J.M.B.M., Hofstra, H. and Huis in't Veld, J.H.J. (1994) RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *Int. J. Food Microb.*, **24**, 249-260
- Bánszky, L. and Maráz, A. (1997) Induction and analysis of selenate-resistant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **44**, 63-64
- Bánszky, L. and Maráz, A. (1999) S³⁵-sulphate uptake of selenate-resistant *Schizosaccharomyces pombe* mutants. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **46**, 142-143
- Bánszky, L. and Maráz, A. (2000) Characterisation of strains belonging to the *Schizosaccharomyces* genus by RAPD fingerprinting and ribotyping. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, **47**, 338
- Bánszky, L., Simonics, T. and Maráz, A. (2003) Sulphate metabolism of selenate-resistant *Schizosaccharomyces pombe* mutants. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **49**, 271-278
- Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S. and Drawert, F. (1986) Identification and determination of volatile constituents in wines from different wine cultivars. *J. Sci. Food. Agri.*, **37**, 927-943
- Bely, M., Salmon, J.M. and Barre, P. (1990) Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. *J. Inst. Brew.*, **100**, 279-282
- Benda, I., and Schmitt, A. (1969) Untersuchungen zum Saureabbau im Most durch verschiedene Hefestämme aus der Gattung *Schizosaccharomyces*. *Weinberg Keller*, **16**, 71-83
- Berendt, U., Haverkamp, T., Prior, A., and Schwenn, J. D. (1995) Reaction mechanism of thioredoxin: 3'-phospho-adenylylsulfate reductase investigated by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 347-356
- Breton, A. and Surdin-Kerjan, Y. (1977) Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Biotechnical and genetic study. *J. Bacteriol.*, **132**, 224-232
- Brzywczy, J. and Paszewski, A. (1994) Sulphur amino acid metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*: occurrence of two O-acetylhomoserine sulphhydrolases and the lack of the reverse transsulphurylation pathway. *FEMS Microbiol. Letters*, **121**, 171-174.
- Brzywczy, J., Sienko, M., Kucharska, A. and Paszewski, A. (2002) Sulphur amino acid synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* represents a specific variant of sulphur metabolism in fungi. *Yeast*, **19**, 29-35.
- Buxton F. P., Gwynne, D. I., and Davies, R.W. (1989) Cloning of a new bidirectionally selectable marker for *Aspergillus* strains. *Gene*, **84**, 329-334

- Carre, E., Lafon-Lafourcade, S. and Bertrand, A. (1983) Desacidification biologique des vins blancs secs par fermentation de l'acide malique par les levures. *Connaissances de la Vigne et du Vin*, **17**, 43-53
- Cherest, H., and Surdin-Kerjan, Y. (1992) Genetics analysis of a new mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: updating of the sulfur metabolism pathway. *Genetics*, **130**, 51-58
- Cherest, H., Davidian, J.-C., Thomas, D., Benes, V., Ansorge, W., and Surdin-Kerjan, Y. (1997) Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **145**, 627-635
- Cherest, H., Kerjan, P., Surdin-Kerjan, Y. (1987) The *Saccharomyces cerevisiae* *MET3* gene: Nucleotide sequence and relationship of the 5' non-coding region to that of *MET25*. *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 307-313
- Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y., Antoniewski, J., and de Robichon-Szulmajster, H. (1973) Effects of regulatory mutations upon methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: loci *eth2-eth3-eth10*. *J. Bacteriol.*, **115**, 1084-1093
- Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y., de Robichon-Szulmajster, H. (1971) Methionine-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*: a pleiotropic regulatory system involving methionyltransfer ribonucleic acid and the product of gene *eth2*. *J. Bacteriol.*, **106**, 758-772
- Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y., Exinger, F. and Lacroute, F. (1978) S-adenosyl methionine requiring mutants in *Saccharomyces cerevisiae*: evidences for the existence of two methionine adenosyl transferases. *Mol. Gen. Genet.*, **163**, 153-167
- Cherest, H., Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1993) Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through the transsulfuration pathway which has been built up by enzyme recruitment. *J. Bacteriol.*, **175**, 5366-5374
- Chiang, P. K. and Cantoni, G. L. (1977) Activation of methionine for transmethylation. Purification of the S-adenosylmethionine synthetase of baker's yeast and its separation into two forms. *J. Biol. Chem.*, **252**, 4506-4513
- Ciani, M. (1995) Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells: evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. *J. Appl. Bacter.*, **79**, 631-634
- Csaikl, U. and Csaikl, F. (1986) Molecular cloning and characterization of the *MET6* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **46**, 207-214
- Deák, T. (1998) Élesztők általános jellemzése. Molekuláris jellemzők. In: Élesztőgombák a természetben és az iparban. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest, pp. 47-62
- Deighton, F. J., Hall, N. K. and Larsh, H. W. (1979) Merthiolate treatment of pathogenic fungi. *J. Clin. Microbiol.* **10**, 144-146
- Delfini, C., Ciolfi, G. and Pagliara, A. (1982) Biological degradation test of malic acid by maloalcoholic fermentation. 2nd contribution: some experimental tests of enological fitness of *Schizosaccharomyces pombe* strain. *Vini Italia*, **24**, 261-265
- Dittrich, H. H. (1963) Versuche zum Äpfelsäureabbau mit einer Hefe der Gattung *Schizosaccharomyces*. *Weinwissenschaft*, **18**, 392-405
- Dittrich, H. H. (1964) Die alkoholische Vergärung der L-Äpfelsäure durch *Schizosaccharomyces pombe* var. *acidodevoratus*. *Zentr. Bakt. Par. Inf. Hyg.*, **118**, 406-421

- Dittrich, H. H. and Sponholz, W. R. (1975) Die Aminosäureabnahme in Botrytis-infizierten Traubenbeeren und die Bildung höherer Alkohole in diesen Mosten bei ihrer Vergärung. *Wein Wissenschaft*, **30**, 188-210
- Dlauchy, D., Tornai-Lehocski, J. and Péter, G. (1999) Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *System. Appl. Microbiol.*, **22**, 445-453
- Dott, W. and Trüper, H. G. (1978) Sulphite formation by wine yeast. VI. Regulation of biosynthesis of NADPH- and BV-dependent sulphite reductases. *Arch. Microbiol.*, **118**, 249-251
- Dreyfuss, J. (1964) Characterization of a sulfate- and thiosulfate- transporting system in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **239**, 2292-2297
- Egel, R. (1989) Mating-type genes, meiosis and sporulation. In: *Molecular Biology of the Fission Yeast*. (eds Nasim, A., Young, P., Johnson, B.) Academic Press, New York, pp. 31-73
- Eschenbruch, R. (1974) Sulfite and sulfide formation during wine making. A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **25**, 157-161
- Eschenbruch, R. (1978) Sulphite and sulphide formation by wine yeasts. In: *5th International Oenological Symposium*, 13-15. February 1978, Auckland, New Zealand, (eds. Lemperle E. and Frank, J.), Eigenverlag der Internationalen Interessengemeinschaft für moderne Kellertechnik und Betriebsführung, Breisach, pp. 267-274
- Eschenbruch, R., Bonish, P. and Fisher, B. M. (1978) The production of H₂S by pure culture wine yeasts. *Vitis*, **17**, 67-74
- Fitzgerald-Hayes, M., Buhler, J. M., Cooper, T. G., and Carbon, J. (1982) Isolation and subcloning analysis of functional centromere DNA (*CEN11*) from *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XI. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 82-87
- Fleet, G.H. (1993) In: *Wine Microbiology and Biotechnology* (ed. Fleet, G. H.), Harward Academic Publishers, Switzerland. p. vii.
- Fournier, P., Gaillardin, C., de Louvencourt, L. Heslot, H., Lang, B. F. and Kaudewitz, F. (1982) r-DNA plazmid from *Schizosaccharomyces pombe*: cloning and use in yeast transformation. *Curr. Genet.*, **6**, 31-38
- Fuck, E. and Radler, F. (1972) Äpfelsäurestoffwechsel bei *Saccharomyces*. I. Der anaerobe Äpfelsäureabbau von *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **87**, 149-164
- Fuck, E., Stärk, G. and Radler, F. (1973) Äpfelsäurestoffwechsel bei *Saccharomyces*. II. Anreicherung und Eigenschaften eines Malatenzyms. *Arch. Microbiol.*, **89**, 223-231
- Gallander, J. (1977) Deacidification of eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **28**, 65-68
- Geleta, A. (1996) Az almasavbontás és flokkuláció fiziológiai és genetikai hátterének vizsgálata *Schizosaccharomyces pombe*-nél. Ph.D. thesis, Budapest, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem
- Gharieb, M. M., Wilkinson, S. C., and Gadd, G. M. (1995) Reduction of selenium oxyanions by unicellular, polymorphism and filamentous fungi: cellular location of reduced selenium and implications for tolerance. *J. Ind. Microbiol.*, **14**, 300-311
- Goniak, O. J. and Noble, A. C. (1987) Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 223-227

- Grobler, J., Bauer, F., Subden, R. E. and Vuuren, H. J. J. (1995) The *mae1* gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a permease for malate and other C₄ dicarboxylic acids. *Yeast*, **11**, 1485-1491
- Guoilloux-Benatier, M., Feuillat, M. and Ciolfi, B. (1985) Contribution à l'étude de la dégradation de l'acide L-malic par les bacteries lactiques isolee du vin. *Vitis*, **24**, 59-62
- Hansen, J. and Kielland-Brandt, M. C. (1996) Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases the level of sulfite in beer. *J. Biotechnology*, **50**, 75-87
- Heinzel, M. A. and Trüper, H. G. (1978) Sulfit formation by wine yeast. V. Regulation of biosynthesis of ATP- and ADP-sulfurylase by sulfur- and selenium-compounds. *Arch. Microbiol.*, **118**, 243-247
- Heinzel, M. A., Dott, W. and Trüper, H. G. (1979) Ursachen einer biologischen SO₂-Bildung bei der Weingärung. *Wein Wissenschaft*, **34**, 192-211
- Henschke, P. A. and Jiranek, V. (1991) Hydrogen sulfide formation during fermentation: effect of nitrogen composition in model grape musts. *Proc. Int. Symp. Nitrogen in Grapes and Wine*, Am. Soc. Enol. Vitic., 18-19 June, Seattle, pp.172-184
- Henschke, P. A. and Jiranek, V. (1993) Yeasts – Metabolism of nitrogen compounds. In: *Wine Microbiology and Biotechnology* (ed Fleet, G. H.), Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp.77-164
- Hilti, N., Gräub, R., Jörg, M., Arnold, P., Schweingruber, A. and Schweingruber, M. E. (2000) Gene *sam1* encoding adenosylmethionine synthetase: effects of its expression in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **16**, 1-10
- Hoffmann, C. S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*, *Gene*, **57**, 267-272
- Hoffmann, U., Köpfer, P. and Werner, A. (1995) *Ökologischer Weinbau*. Ulmer-Verlag, Stuttgart, p. 186
- Hussey, C., Orsi, B.A., Scott, J. and Spencer, B. (1965) Mechanism of choline sulphate utilization in fungi. *Nature*, **207**, 632-634
- Isnard, A. D., Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y. (1996) The study of methionine uptake in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a new family of amino acid permeases. *J. Mol. Biol.*, **262**, 473-484
- Jiranek, V., Langride, P., and Henschke, P.A. (1995) Regulation of Hydrogen Sulfide Liberation in Wine-Producing *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Assimilable Nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 461-467
- Johannsen, E (1981) Hybridization studies within the genus *Schizosaccharomyces* Lindner. *Can. J. Microbiol.*, **27**(2),184-191
- Jones, E. W. and Fink, G. R. (1982) Regulation of amino acid and nucleotide biosynthesis in yeast. In: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression* (eds. Strathern, J.N., Jones, E.W., Broach J.R.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 181-299.
- Klonus, D., Hofgen, R., Willmitzer, L. and Riesmeier, J. W. (1994) Isolation and characterization of two cDNA clones encoding ATP-sulfurylase from potato by complementation of a yeast mutant. *Plant J.*, **6**, 105-112
- Klonus, D., Reismeier, J. W. and Willmitzer, L. (1995) A cDNA clone for an ATP-sulfurylase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **107**, 653-654

- Kobayashi, K and Yoshimoto, A. (1982a) Studies on the yeast sulfite reductase IV. Structure and steady-state kinetics. *Biochim. Biophys. Acta*, **705**, 348-356
- Kobayashi, K and Yoshimoto, A. (1982b) Studies on the yeast sulfite reductase V. Effects of ionic strength on enzyme activities. *Biochim. Biophys. Acta*, **709**, 38-45
- Kobayashi, K and Yoshimoto, A. (1982c) Studies on the yeast sulfite reductase VI. Use of the effects of ionic strength as a probe for enzyme structure and mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, **709**, 46-52
- Kohli, J., Hottinger, H., Munz, P., Strauss, A., and Thuriaux, P. (1977) Genetic mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization. *Genetics*, **87**, 471-489
- Korch, C., Mountain, A. H. and Byström, A. S. (1991) Cloning, nucleotide sequence and regulation of *MET14*, the gene encoding the APS kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **228**, 96-108
- Kreger-van Rij, N. J. W. (1984) *The Yeast. A Taxonomic Study*, Elsevier, Amsterdam
- Kuras, L. and Thomas, D. (1995) Identification of the yeast methionine biosynthetic genes that require the centromere factor I for their transcriptional activation. *FEBS Lett.*, **367**, 15-18
- Kuras, L., Cherest, H., Surdin-Kerjan, Y. and Thomas, D. (1996) A heteromeric complex containing the centromere binding factor 1 and two basic leucine zipper factors, Met4 and Met28, mediates the transcription activation of yeast sulfur metabolism. *EMBO J.*, **15**, 2519-2529
- Kurtzmann, C.P. (1992) rRNA Sequence Comparisons for Assessing Phylogenetic Relationships among Yeasts. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **42**, 1-6
- Kurtzmann, C.P. (1994) Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, **10**, 1727-1740
- Kurtzmann, C.P. and Phaff, H.J. (1987) Molecular taxonomy of yeasts. In: *The yeasts Vol.1* (eds. Rose, A.H. and Harrison, J.S.). Academic Press, New York, pp. 63-94
- Kurtzmann, C.P. and Robnett, C.J. (1991) Phylogenetic Relationships Among Species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaromyces* and *Schwanniomyces* Determined from Partial Ribosomal RNA Sequences. *Yeast*, **7**, 61-72
- Lafon-Lafourcade, S., Lonvaud-Funel, A. and Carre, E. (1983) Lactic acid bacteria of wines: stimulation of growth and malolactic fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, **49**, 349-352
- Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **21**, 97-129
- Lang, B. F., Cedergren, R. and Gray, M. W. (1987) The mitochondrial genome of fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Sequence of the large subunit ribosomal RNA gene, comparison of potential secondary structure in fungal mitochondrial large-subunit rRNAs and evolutionary considerations. *Eur. J. Biochem.*, **169**, 527-537
- Lauchli, A. (1993) Selenium in plants: uptake, functions and environmental toxicity. *Bot. Acta* **106**, 455-468
- Lemperle, E. (1981) Neuere Untersuchungen zum Bockser des Weines. *Die Weinwirtschaft*, **5**, 129-132
- Leppänen, O. A., Denslow, J. and Ronkainen, P. P. (1980) Determination of thiolacetates and some other volatile sulfur compounds in alcoholic beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **28**, 359-362

- Leupold, U. (1993) The origin of *Schizosaccharomyces pombe* genetics. In: The early days of yeast genetics (eds. Hall, M.N., Linder, P.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 125-128
- Logan, H. M., Cathala, N., Grignon, C. and Davidian, J. C. (1996) Cloning of a cDNA encoded by a member of the *Arabidopsis thaliana* ATP sulphurylase multigene family. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12227-12233
- Loubser, G. J. and Du Plessis, C. S. (1976) The quantitative determination and some values of dimethyl sulphide in white table wines. *Vitis*, **15**, 4, 248-252
- Lucas, de J. R., Dominguez, A.I., Higuero, Y., Martinez, O., Romero, B., Mendoza, A., Garcia-Bustos, J. F. and Laborda, F. (2001) Development of a homologous transformation system for the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus* based on the *sC* gene encoding ATP sulfurylase. *Arch. Microbiol.* **176**, 106-113
- Maconi, E., Manochini, P. L., Aragozzini, F., Gennari, C. and Ricca, G. S. (1984) A study of a maloalcoholic fermentation pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. J.*, **217**, 585-588
- Macris, B.J. and Markakis, P. (1974) Transport and toxicity of sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoidus*. *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 21-29
- Magyar, I. and Panyik, I., (1989) Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**(4), 233-240
- Marais, J. (1979) Effect of storage time and temperature on the formation of dimethyl sulphide on white wine quality. *Vitis*, **18**, 254-260
- Maráz, A. and Geleta, A. (2001) Ethanol-induced cell aggregation (flocculation) and its physiological background in *Schizosaccharomyces pombe* RIVE 4-2-1. *Acta Biol. Hung.*, **52**, 231-239
- Marzluf, G. A. (1994) Genetics and molecular genetics of sulfur assimilation in the fungi. *Adv. Genet.*, **31**, 187-206
- Masclaux, F., Gueho, E., De Hoog, G.S., and Villard, J. (1996) Intraspecific variability within species of *Cladophialophora* and *Cladosporium* using arbitrary primed PCR. *J. Micol. Méd.*, **6**, 15-18
- Masselot, M. and Surdin-Kerjan, Y. (1977) Methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. II Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway. *Mol. Gen. Genet.*, **154**, 23-30
- Maw, G. A. (1963a) Sulphur utilization by yeast. *Pure Appl. Chem.*, **7**, 655-668
- Maw, G. A. (1963b) The uptake of inorganic sulphate by a brewer's yeast. *Folia Microbiol.*, **8**, 325-332
- Maw, G. A. (1963c) The uptake of some sulphur-containing amino acids by a brewer's yeast. *J. Gen. Microbiol.*, **31**, 247-259
- Maw, G. A. (1965) The role of sulfur in yeast growth and in brewing. *Wallerstein Communication*, **95**, 49-70
- Miyake, T., Sammoto, H., Kanayama, M., Tomochika, K., Shinoda, S. and Ono, B. (1999) Role of the sulphate assimilation pathway in utilization of glutathione as a sulphur source by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1449-1457
- Monk, P. R. (1986) Formation, utilisation and excretion of hydrogen sulphide by wine yeast. *Wine Industry Journal*, **11**, 10-16

- Mora, de S. J., Knowles, S. J., Eschenbruch, R. and Torrey, W. J. (1987) Dimethyl sulphide in some Australian red wines. *Vitis*, **26**, 79-84
- Mountain, H. A., Byström, A. S. and Korch, C. (1993) The general amino acid control regulates *MET4*, which encodes a methionine-pathway-specific transcriptional activator of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **7**, 215-228
- Mountain, H. A., Byström, A. S., Tang Larsen, J. and Korch, C. (1991) Four major transcriptional responses in the methionine/threonine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**, 781-803
- Munz, P., Wolf, K., Kohli, J. and Leupold, U. (1989) Genetic Overview. In: *Molecular Biology of the Fission Yeast*. (eds. Nasim, A., Young, P., Johnson, B. F.) Academic Press, New York, pp. 1-30
- Naiki, N. and Yamagata, S. (1973) Isolation of O-acetylhomoserine from culture broth of a methionine auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant. Cell. Physiol.*, **14**, 1193-1197
- Naula, N., Walther, C., Baumann, D. and Schweingruber, M. E. (2002) Two non-complementing genes encoding enzymatically active methylenetetrahydrofolate reductases control methionine requirement in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **19**, 841-848
- Németh, E. (1995) A *Schizosaccharomyces pombe* törzsek növekedését és szulfidtermelését befolyásoló tényezők vizsgálata. Diplomamunka, Budapest, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem
- Novo, M.T.M., de Souza, A.P., Garcia, O.J.R. and Ottoboni, L.M.M. (1996) RAPD genomic fingerprinting differentiates *Thiobacillus ferrooxidans* strains. *System. Appl. Microbiol.*, **19**, 91-95
- Omura, F., Shibano, Y., Fukui, N. and Nakatani, K. (1995) Reduction of hydrogen sulfide production in brewing yeast by constitutive expression of *MET25* gene. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **53**, 58-62
- Ono, B. and Naito, K. (1991) The cysteine transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **7**, 849-855
- Ono, B., Heike, C., Yano, Y., Inoue, T., Naito, K., Nakagami, S. and Yamane, A. (1992) Cloning and mapping of the *CYS4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **21**, 285-289
- Ono, B., Kazuyasu, K., Nobuya, I., Takahiro, K., Akio, M., Paszewski, A. and Sumio, S. (1996) Regulation of sulphate assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 1153-1162
- Ono, B., Shirahige, Y., Nanjoh, A., Andou, N., Ohue, H. and Ishino-Arao, Y. (1988) Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: mutation that confers cystathionine beta-synthase deficiency. *J. Bacteriol.*, **170**, 5883-5889
- Osotshilp, C. and Subden, E. (1986a) Malate transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bact.*, **168**, 1439-1443
- Osotshilp, C. and Subden, E. (1986b) Isolation and characterisation of *Schizosaccharomyces pombe* mutants with defective NAD-dependent malic enzyme. *Can. J. Microbiol.*, **32**, 481-486
- Pardee, A.B., Prestidge, L.S., Whipple, M.B. and Dreyfuss, J. (1966) A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **241**(17), 3962-3969

- Peck, H. D. and Lissolo, D. (1988) Assimilatory and dissimilatory sulphate reduction: enzymology and bioenergetics. In: nitrogen and sulphur cycles. (eds. Cole, J.A. and Ferguson, S.J.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 99-132
- Pinson, B., Sagot, I. and Daignan-Fornier, B. (2000) Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Micro.* **36** (3), 679-687
- Porqué, P. G., Baldesten, A. and Reichard, P. (1970) The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2371-2374
- Radler, F. (1993) Yeast – metabolism of organic acids. In: Wine microbiology and biotechnology (ed. Fleet G.H.) Harwood Academic Publishers, pp. 165-182
- Rankine, B. C. (1968) The importance of yeasts in determining the composition and quality of wines. *Vitis*, **7**, 22-49
- Rapp, A., Günter, M. and Almy, J. (1985) Identification and significance of several sulfur-containing compounds in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**(3), 219-221
- Raspor, P., Fujs, S., Bánszky, L., Maráz, A. and Batic, M. (2003) The involvement of ATP sulfurylase in Se(VI) and Cr(VI) reduction processes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 89-95
- Rauhut, D. (1993) Yeast - Production of sulfur compounds. In: Wine Microbiology and Biotechnology (ed. Fleet, G. H.) pp.183-223, Harwood Academic Publishers, Switzerland
- Rauhut, D. (1996) Qualitätsmindernde schwefelhaltige Stoffe im Wein – Vorkommen, Bildung, Beseitigung. Ph.D Thesis, Gießen
- Rauhut, D. und Kürbel, H. (1994a) Die Entstehung von H₂S aus Netzschwefel-Rückständen während der Gärung und dessen Einfluß auf die Bildung von böckserverursachenden schwefelhaltigen Metaboliten in Wein. *Vitic. Enol. Sci.*, **49**, 27-36
- Rauhut, D. und Kürbel, H. (1994b) Analysis of volatile sulfur compounds in wine using gas chromatography with a sulfur chemiluminescence detector. 16th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy, pp. 732-741
- Rauhut, D., Kürbel, H., Dittrich, H. H., Prior, B. und Großmann, M (1995) Einfluss von Hefestämmen und deren Ernährung auf die Böckserbildung, in: 100 Weinjahrgänge mit Reinzuchtheffen aus Geisenheim, pp. 38-55, Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie
- Robichon-Szulmajster, H. de and Surdin-Kerjan, Y. (1971) Nucleic acid and protein synthesis in yeast: regulation of synthesis and activity. In: The Yeast, Vol. 2., Physiology and Biochemistry of Yeasts (eds. Rose, A. H. and Harrison, J. S.), Academic Press, London, New York, pp. 335-418
- Romano, P. and Suzzi, G. (1992) Production of H₂S by different yeast strains during fermentation. *Proc. Conv. Inst. Brew., Aust. N. Z. Sect.*, Melbourne, Nr. **22**, 96-98
- Roomans, G. M., Kuypers, G.A.J., Theuvenet, A.P.R. and Borst-Pauwels, G.V.F.H. (1979) Kinetics of sulfate uptake by yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 197-206
- Rosini, G. and Ciani, M. (1993) Influence of sugar type and level on malate metabolism of immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 113-117
- Rosini, G., Federici, F., Vaughan, A.E. and Martini, A. (1982) Systematics of the species of the yeast genus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 188-193
- Salmon, J. M. (1987) L-malic acid permeation in resting cells of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **901**, 30-34

- Schmitt, A., Köhler, H., Miltenberger, R. und Curschmann, K. (1986) Einfluß von Pflanzenschutzmitteln auf Most und Wein. I. Der Deutsche Weinbau, **41**, 323-329
- Schriek, U. and Schwenn, J. D. (1986) Properties of the purified APS-kinase from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol., **145**, 32-38
- Schutte, L. (1975) Precursors of sulfur-containing flavor compounds. In: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, Kiadó: T. E. Furia and N. Bellanca, Cleveland, Ohio: CRC Press. 132-183
- Schütz, M. und Kunkee, E. (1977) Formation of hydrogen sulfide from elemental sulfur during fermentation by wine yeast. Am. J. Enol. Vitic., **28**, 137-144
- Schweingruber, A. M., Hilti, N., Edenharter, E. and Schweingruber, M. E. (1998) Methionine induces sexual development in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* via a *ste11*-dependent signalling pathway. J. Bacteriol. **180**, 6338-6341
- Shibagaki, N., Rose, A., McDermott, J. P., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Davies, J. P. (2002) Selenate resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* identify *Sulfr1,2*, a sulphate transporter required for efficient transport of sulphate into roots. The Plant Journal **29** (4), 475-486
- Simpson, R. F. (1979) Aroma composition of bottle aged white wine. Vitis, **18**, 148-154
- Sipiczki, M. (1979) Interspecific protoplast fusion in fission yeasts. Curr. Microbiol., **3**, 37-40
- Sipiczki, M. (1995) Phylogenesis of fission yeasts. Contradictions surrounding the origin of a century old genus. Antonie van Leeuwenhoek, **68**, 119-149
- Sipiczki, M. (2000) Where does fission yeast sit on the tree of life? Genome Biol., **1**, 1011.1-4
- Sipiczki, M., Kucsera, J., Ulaszewski, S. and Zsolt, J. (1982) Hybridization studies by crossing and protoplast fusion within the genus *Schizosaccharomyces* Lindner. J. Gen. Microbiol., **128**, 1989-2000
- Slaughter, J. C. (1989) Sulphur compounds in fungi. In: Nitrogen, Phosphorous and Sulphur Utilization by Fungi (eds. Boddy, L., Marchant, R. and Read, D. J.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 91- 105
- Smith, C. L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J. B., Yanagida, M. and Cantor, C. R. (1987) An electrophoretic kariotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. Nucl. Acids Res., **15**, 4481-4489
- Smith, F. W., Hawkswford, M. J., Prosser, I. M. and Clarkson, D. T. (1995) Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. Mol. Gen. Genet. **247**, 709-15
- Smole Mozina, S., Dlačny, D., Deák, T. and Raspor, P. (1997) Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulaspora* yeasts by PCR ribotyping. Lett. Appl. Microbiol., **24**, 311-315
- Snow, P.G. and Gallander, J. F. (1979) Deacidification of white table wine through partial fermentation with *Schizosaccharomyces pombe*. Am. J. Enol. Vitic. **30**, 45-48
- Steele, J. T. and Kunkee, R. E. (1978) Deacidification of musts from the Western United States by the calcium double-salt precipitation process. Am. J. Enol. Vitic., **29**, 153-157
- Stratford, M. and Rose, A. H. (1985) Hydrogen sulphide production from sulphite by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., **131**, 1417-1424
- Stratford, M. and Rose, A. H. (1986) Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol., **132**, 1-6

- Sunnerhagen, P. (2002) Prospect for functional genomics in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.*, **42**(2), 73-84
- Suomalainen, H. and Oura, E. (1971) Yeast nutrition and solute uptake. In: *The Yeast*, Vol. 2., Physiology and Biochemistry of Yeasts (eds. Rose, A. H. and Harrison, J. S.), Academic Press, London, New York, pp. 3-74
- Surdin-Kerjan, Y., Cherest, H. and Robinchon-Szulmajster, H. de (1976) Regulation of methionine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* operates through independent signals: methionyl-tRNA^{met} and S-adenosylmethionine. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **23**, 109-120
- Taillander, P., Riba, J. P. and Strehaiano, P. (1988) Malate utilization by *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotech. Lett.*, **10**, 469-472
- Temperli, A., Künsch, U., Mayer, K. and Busch, I. (1965) Reinigung und Eigenschaften der Malatdehydrogenase (decarboxilierend) aus Hefe. *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 630-632
- Tezuka, H., Mori, T., Okumura, Y., Kitabatake, K. and Tsumura, Y. (1992) Cloning of a gene suppressing hydrogen sulfide production by *Saccharomyces cerevisiae* and its expression in a brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **50**, 130-133
- Thomas, C. S., Boulton, R. B., Silacci, M. W. and Gubler, W., D. (1993) The effect of elemental sulfur, yeast strain and fermentation medium on hydrogen sulfide production during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 211-216
- Thomas, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1997) Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 503-532.
- Thomas, D., Barbey, R. and Surdin-Kerjan, Y. (1990) Gene-enzyme relationship in the sulfate assimilation pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Study of the 3'-phosphoadenylylsulfate reductase structural gene. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15518-15524
- Thomas, D., Barbey, R., Henry, D. and Surdin-Kerjan, Y. (1992b) Physiological analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in sulphate assimilation. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2021-2028
- Thomas, D., Jaquemin, I. and Surdin-Kerjan, Y. (1992a) *MET4*, a leucine zipper protein, and centromere-binding factor 1 are both required for transcriptional activation of sulfur metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1719-1729
- Thurston, P. A., Quain, D. E. and Tubb, R. S. (1982) Lipid metabolism and the regulation of volatile ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, **88**, 90-104
- Tiran, B., Tiran, A., Rossipal, E. and Lorenz, O. (1993) Simple decomposition procedure for determination of selenium in whole blood serum and urine by hydride generation atomic absorption spectroscopy. *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.*, **7**, 211-216
- Ullrich, T. C., Blaesse, M. and Huber, R. (2000) Crystal structure of ATP sulfurylase from *Saccharomyces cerevisiae*, a key enzyme in sulfate activation. *The EMBO J.*, **20**, 316-329
- Varga, E. (1992) Almasavbontó *Schizosaccharomyces pombe* törzsek kénhidrogén termelésének vizsgálata. Diplomamunka, Budapest, Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem
- Vas, Gy., Blechschmidt, I., Kovács, T., and Vékey, K. (1999) Examination of Aroma Production Kinetics of Different Commercial Wine Yeasts in Fermenting Muscat Ottonel Wines with the Help of SPME Head-Space Sampling and Fast GC Analysis. *Acta Alimentaria*, **28**(2), 133-140

- Vaughan-Martini, A. (1991) Evaluation of phylogenetic relationships among fission yeast by nDNA/nDNA reassociation and conventional taxonomic criteria. *Yeast*, **7**, 73-78
- Vaughan-Martini, A. and Kurtzman, C.P. (1985) Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 508-511
- Vaughan-Martini, A. and Martini, A. (1987) Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **53**, 77-84
- Vaughan-Martini, A. and Martini, A. (1998) *Schizosaccharomyces* Lindner. In: *The Yeasts*, a taxonomic study (eds. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W.), Elsevier, pp. 391-394
- Volschenk, H., van Vuuren, H. J. J. and Viljoen-Bloom, M. (2003) Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr. Genet.*, **43**, 379-391
- Vos, P. J. A. (1981) Assimilierbar Stickstoff, ein Faktor, der die Weinqualität beeinflusst. In: *6. Internationales Önologisches Symposium*, 28-30. April 1981, Mainz, Germany (eds. Lemperle, E. and Frank, J.), Eigenverlag der Internationalen Interessengemeinschaft für Kellertechnik und Betriebsführung, Breisach, pp. 163-180
- Vos, P. J. A. and Gray, R. S. (1979) The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 187-197
- Wenzel, K. and Dittrich, H. H. (1978) Zur Beeinflussung der Schwefelwasserstoff-Bildung der Hefe durch Trub, Stickstoffgehalt, molekularen Schwefel und Kupfer bei der Vergärung von Traubenmost. *Wein Wissenschaft*, **33**, 200-213
- Wenzel, K., Dittrich, H. H., Seyffardt, H. P. and Bohnert, J. (1980) Schwefelrückstände auf Trauben im Most und ihr Einfluß auf die H₂S-Bildung. *Wein Wissenschaft*, **35**, 414-420
- Wiame, J. M., Grenson, M. and Arst, H. N. (1985) Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Adv. Microb. Physiol.*, **26**, 1-88
- Williams, A. A. (1982) Recent developments in the field of wine flavour research. *Journal of the Institute of Brewing*, **88**, 43-53
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingery, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acid Res.*, **18**, 6531-6535
- Wilson, L. G., Asahi, T. and Bandurski, R. S. (1961) Yeast sulfate reducing system I. Reducing of sulfate to sulfite. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1822-1829
- Wolf, K. and Del Guidice, L. (1988) The variable mitochondrial genome of ascomycetes: organization, mutational alterations and expression. *Adv. Genet.* **25**, 185-208
- Wood, V. et al (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **415**, 871-880
- Würdig, G. (1989) Beseitigung eines Böckers. In: *Chemie des Weines. Handbuch der Lebensmitteltechnologie* (eds. Würdig, G. and Woller, R.). Ulmer-Verlag, Stuttgart, pp. 322-326
- Yamada, Y. and Banno, I. (1987) *Hasegawaea* gen. nov., an ascosporeogenous yeast genus for the organisms whose asexual reproduction is by fission and whose ascospores have smooth surface without papillae and which are characterised by the absence of coenzyme Q and by the presence of linoleic acid in cellular fatty acid composition. *J. Gen. Microbiol.*, **33**, 295-298
- Yamagata, S. (1989) Roles of O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase in microorganisms. *Biochemie*, **71**, 1125-1143

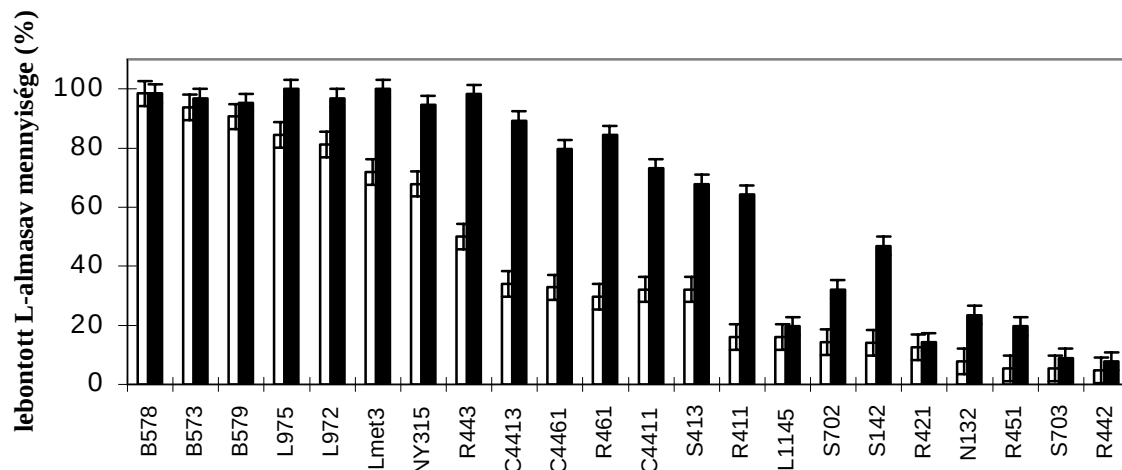
- Yamagata, S., D'Andrea, R. J., Fujisaki, S., Isaji, M. and Nakamura, K. (1993) Cloning and bacterial expression of the *CYS3* gene encoding cystathionine gamma-lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. *J. Bacteriol.*, **175**, 4800-4808
- Yokotsuka, K., Otaki, A., Naitoh, A., and Tanaka, H. (1993) Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of a high-acid grape must using two immobilized yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 371-377
- Yoshimoto, A. and Sato, R. (1968) Studies on yeast sulfite reductase. I. Purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 555-575

Mellékletek

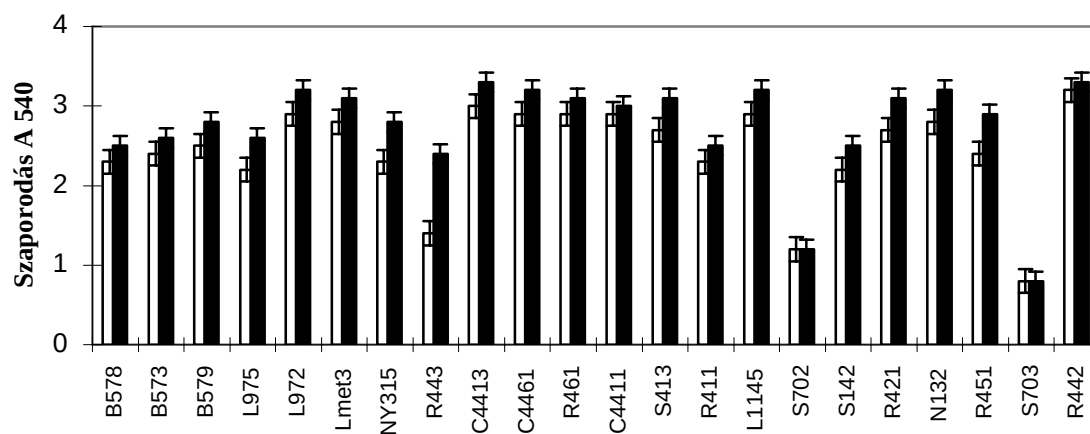
- 1. sz. melléklet:** *Schizosaccharomyces pombe* és *Schizosaccharomyces octosporus* törzsek almasav bontása (A), szaporodása (B) és H₂S termelése (C)
(0% etanol, 1 % glükóz, pH=3.3, 25 °C)
- 2. sz. melléklet:** Teljes ionáram kromatogramm az L.972 törzs fermentációját követően YEPD táplevesben
- 3. sz. melléklet:** Teljes ionáram kromatogramm a B 579 törzs fermentációját követően YEPD táplevesben
- 4. sz. melléklet:** Teljes ionáram kromatogramm a B 579 Se^R-2 törzs fermentációját követően YEPD táplevesben
- 5. sz. melléklet:** Teljes ionáram kromatogramm az L.972 törzs fermentációját követően mustban
- 6. sz. melléklet:** Teljes ionáram kromatogramm a B 579 törzs fermentációját követően mustban
- 7. sz. melléklet:** Teljes ionáram kromatogramm a B 579 Se^R-2 törzs fermentációját követően mustban

1. sz. melléklet *Schizosaccharomyces pombe* és *Schizosaccharomyces octosporus* törzsek almasav bontása (A), szaporodása (B) és H₂S termelése (C) (0% etanol, 1 % glükóz, pH=3.3, 25 °C)

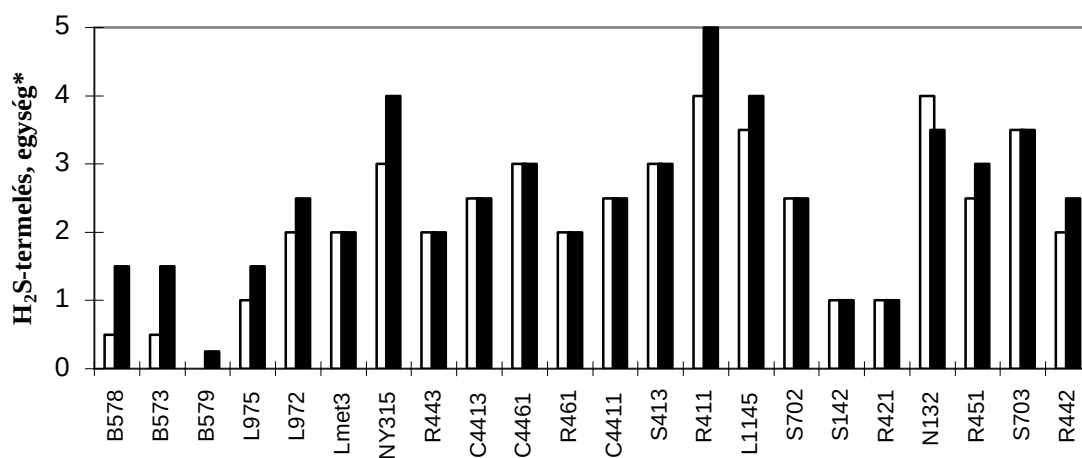
A



B



C

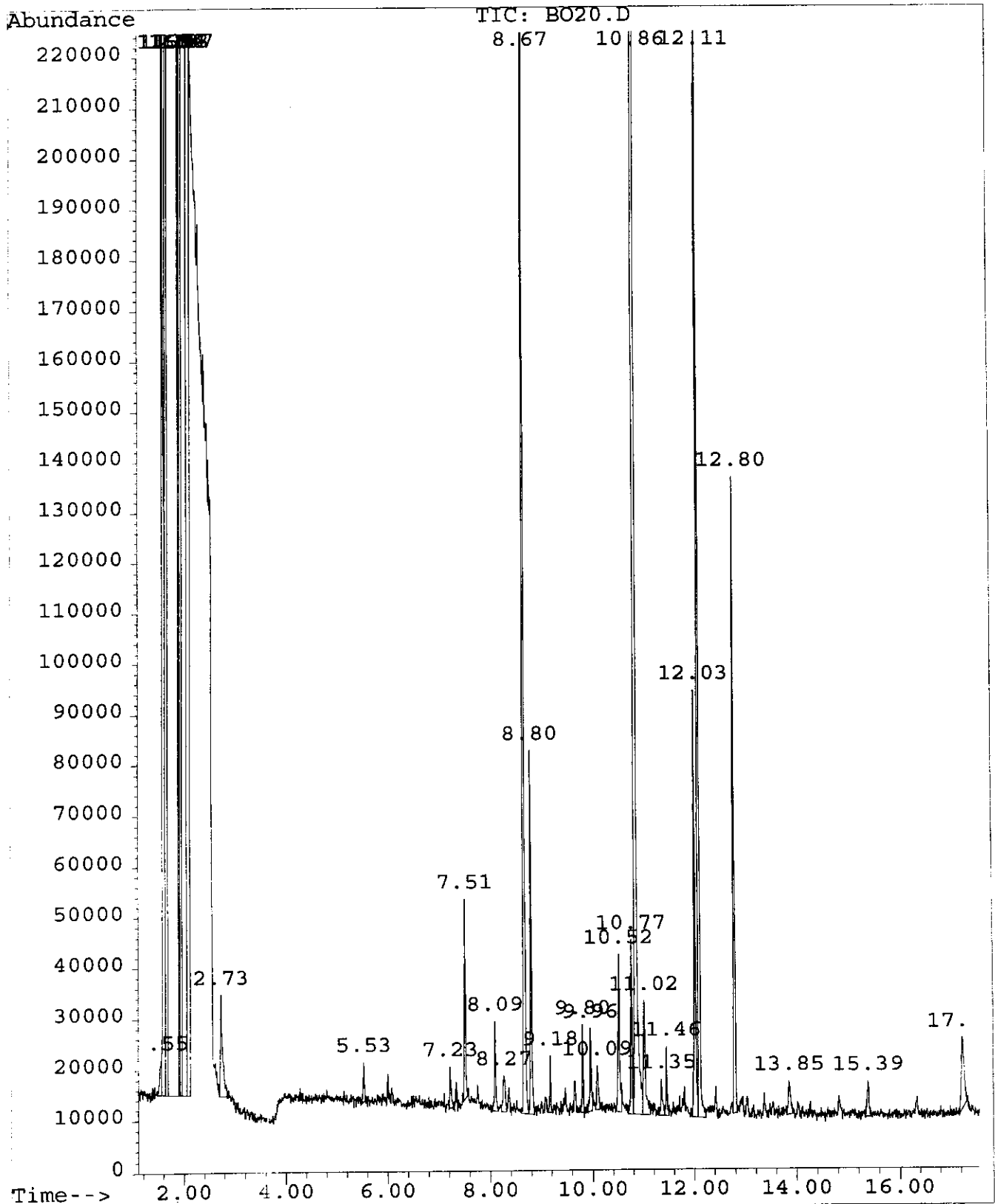


*H₂S termelés egysége: önkényes skála 0-5 között a H₂S termelés erősségének megfelelően az ólom-acetátos szűrőpapírcsík elfeketedése alapján

□ 2 nap elteltével ■ 7 nap elteltével

2. sz. melléklet

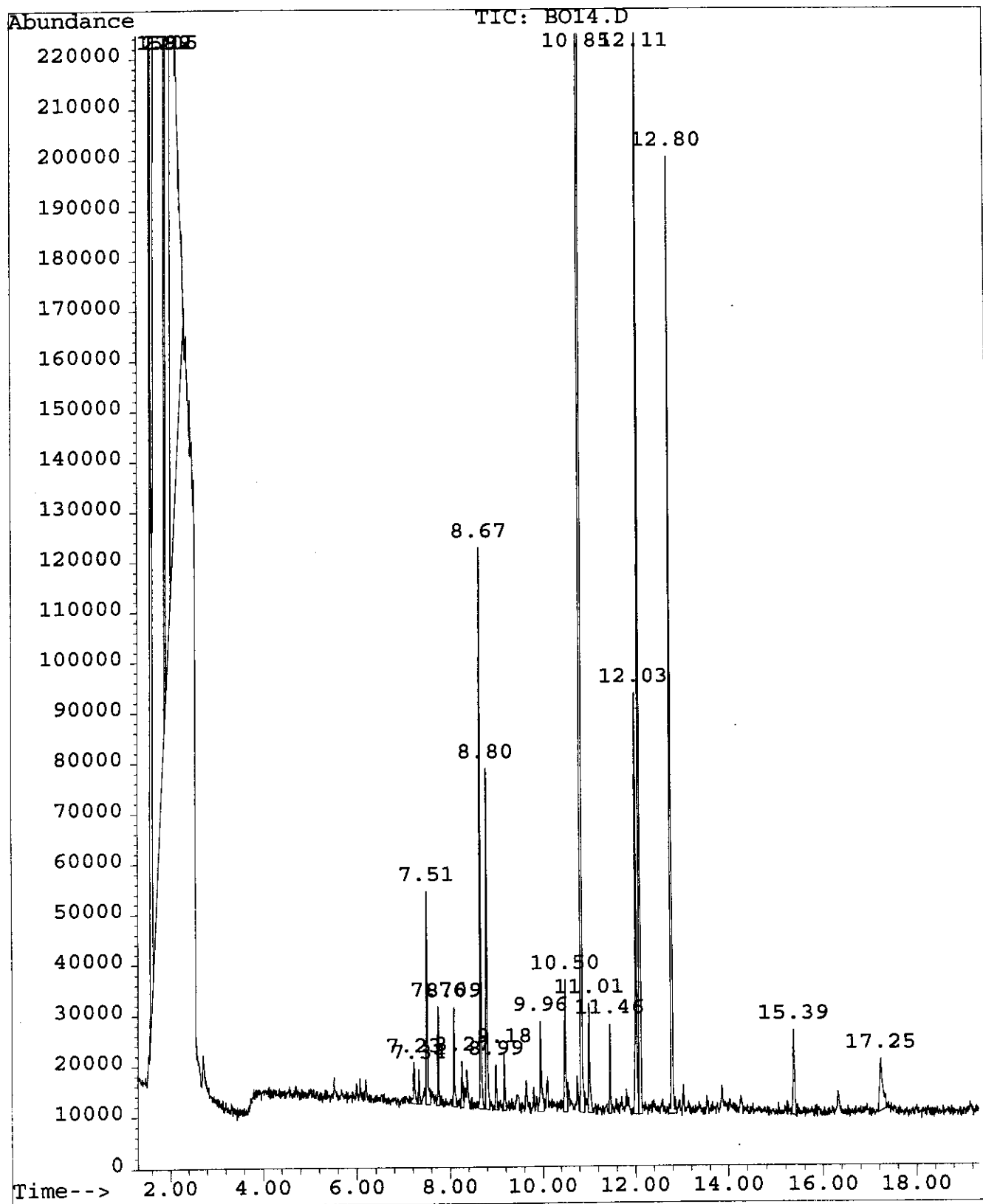
File : C:\HPCHEM\1\DATA\BO20.D
Operator : toth
Acquired : 29 Jun 100 2:47 pm using AcqMethod BOR
Instrument : GC/MS
Sample Name: L972h YEPD
Misc Info : SPME 40 fok, 10p,2p, bor.m
Vial Number: 1



Teljes ionáram kromatogramm az L.972 törzs fermentációját követően YEPD táplevesben

3. sz. melléklet

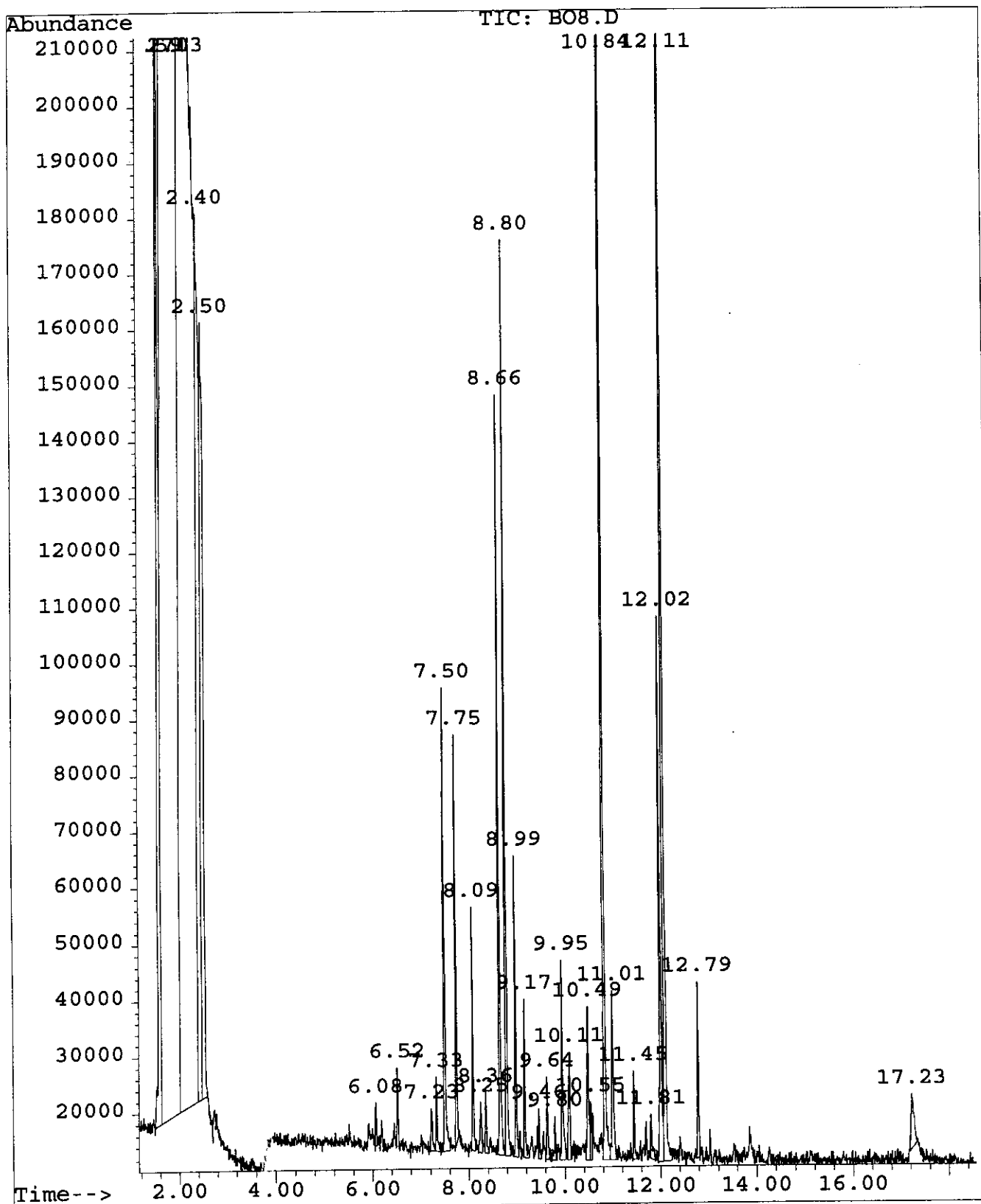
File : C:\HPCHEM\1\DATA\BO14.D
Operator : toth
Acquired : 28 Jun 100 2:53 pm using AcqMethod BOR
Instrument : GC/MS
Sample Name: B579 YEPD párhuzamos 2
Misc Info : SPME 40 fok, 10p, 2p, bor.m
Vial Number: 1



Teljes ionáram kromatogramm a B 579 törzs fermentációját követően YEPD táplevesben

4. sz. melléklet

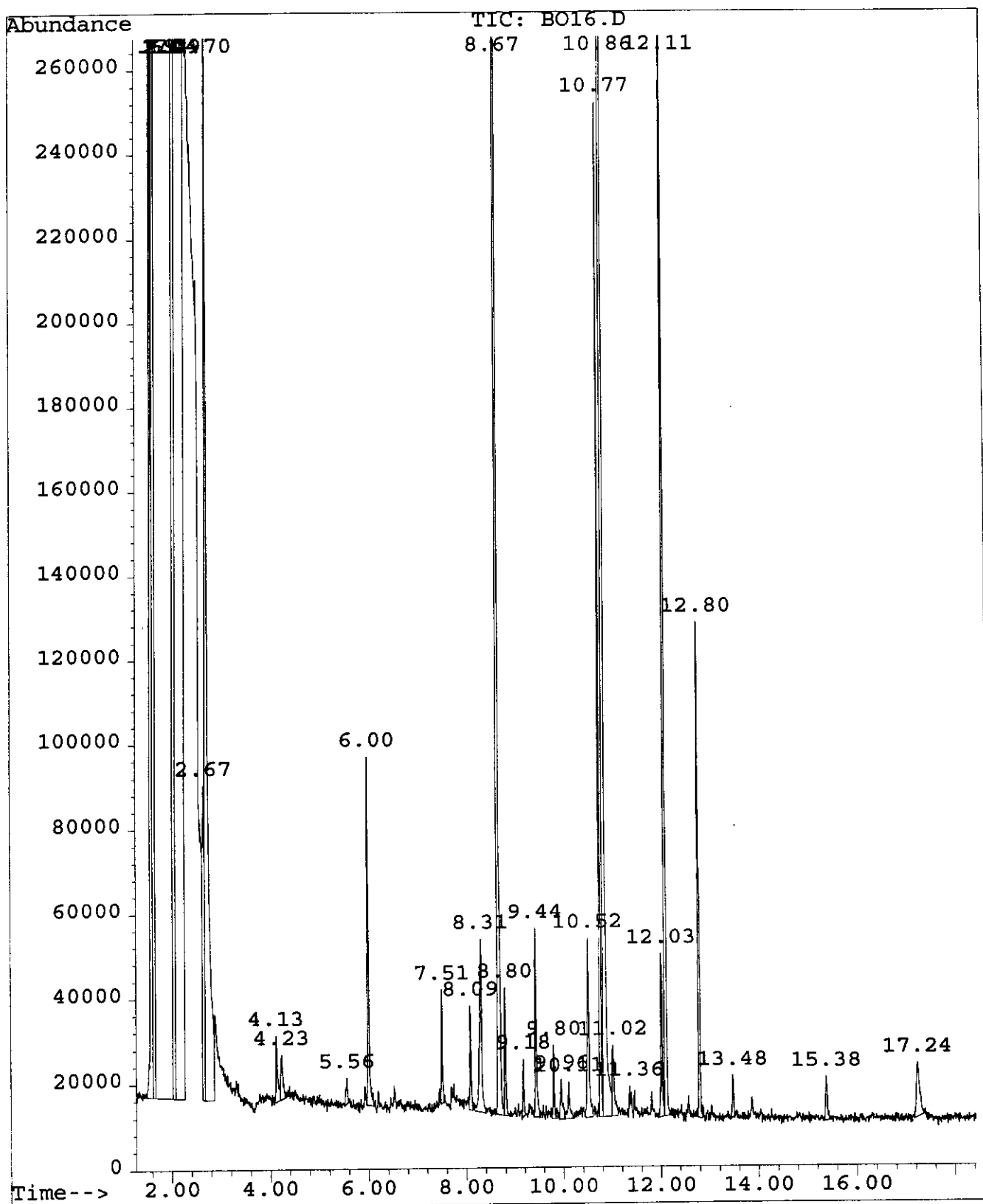
File : C:\HPCHEM\1\DATA\B08.D
 Operator : toth
 Acquired : 27 Jun 100 3:30 pm using AcqMethod BOR
 Instrument : GC/MS
 Sample Name: B579 SeR-2 YEPD táptalaj 3. minta
 Misc Info : SPME, 40 fok 10p, 2p, bor.m
 Vial Number: 1



Teljes ionáram kromatogramm a B 579 Se^R-2 törzs fermentációját követően YEPD táplevesben

5. sz. melléklet

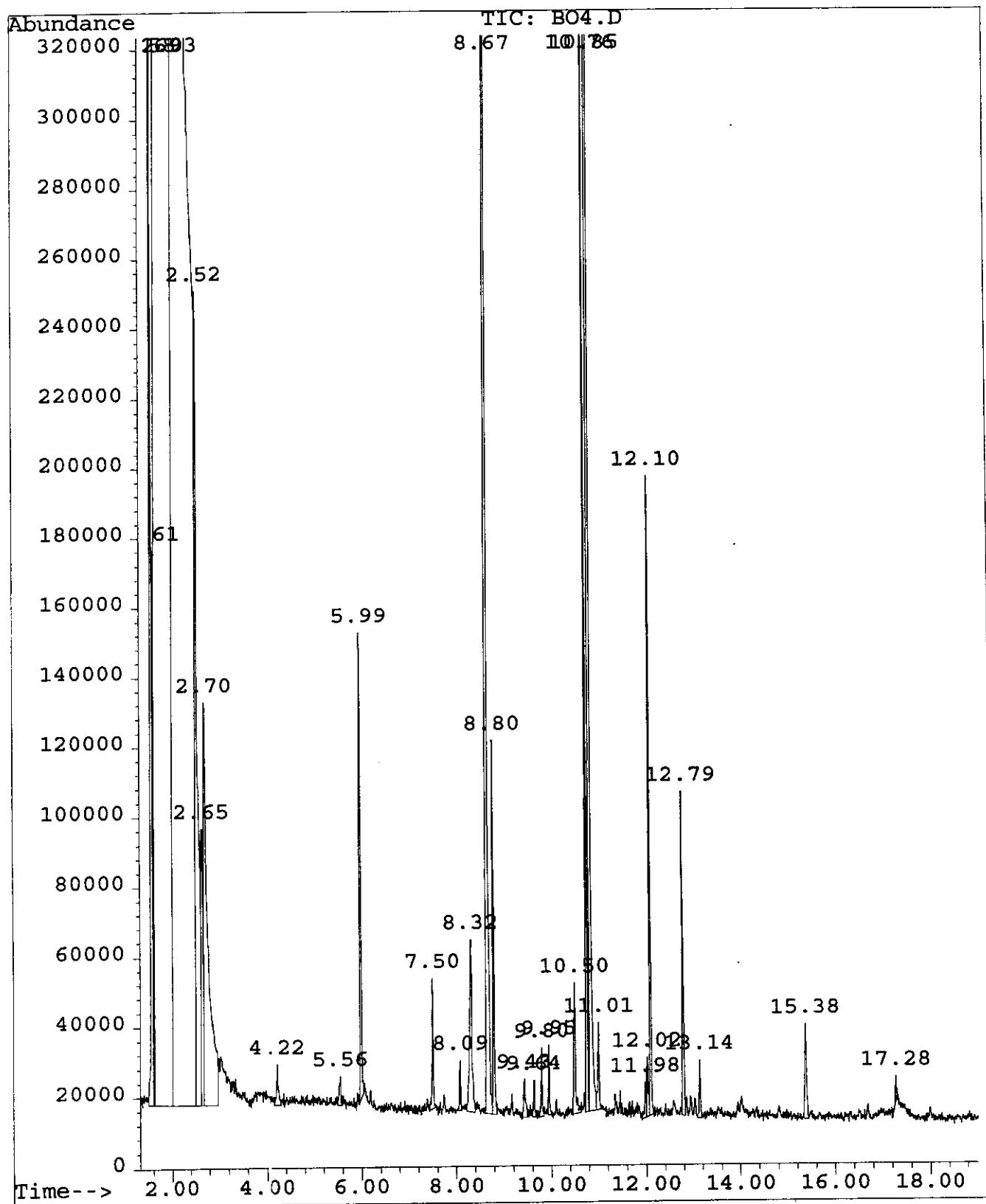
File : C:\HPCHEM\1\DATA\BO16.D
 Operator : toth
 Acquired : 29 Jun 100 10:30 am using AcqMethod BOR
 Instrument : GC/MS
 Sample Name: L972h/2
 Misc Info : SPME40 fok, 10p,2p, bor.m
 Vial Number: 1



Teljes ionáram kromatogramm az L.972 törzs fermentációját követően mustban

6. sz. melléklet

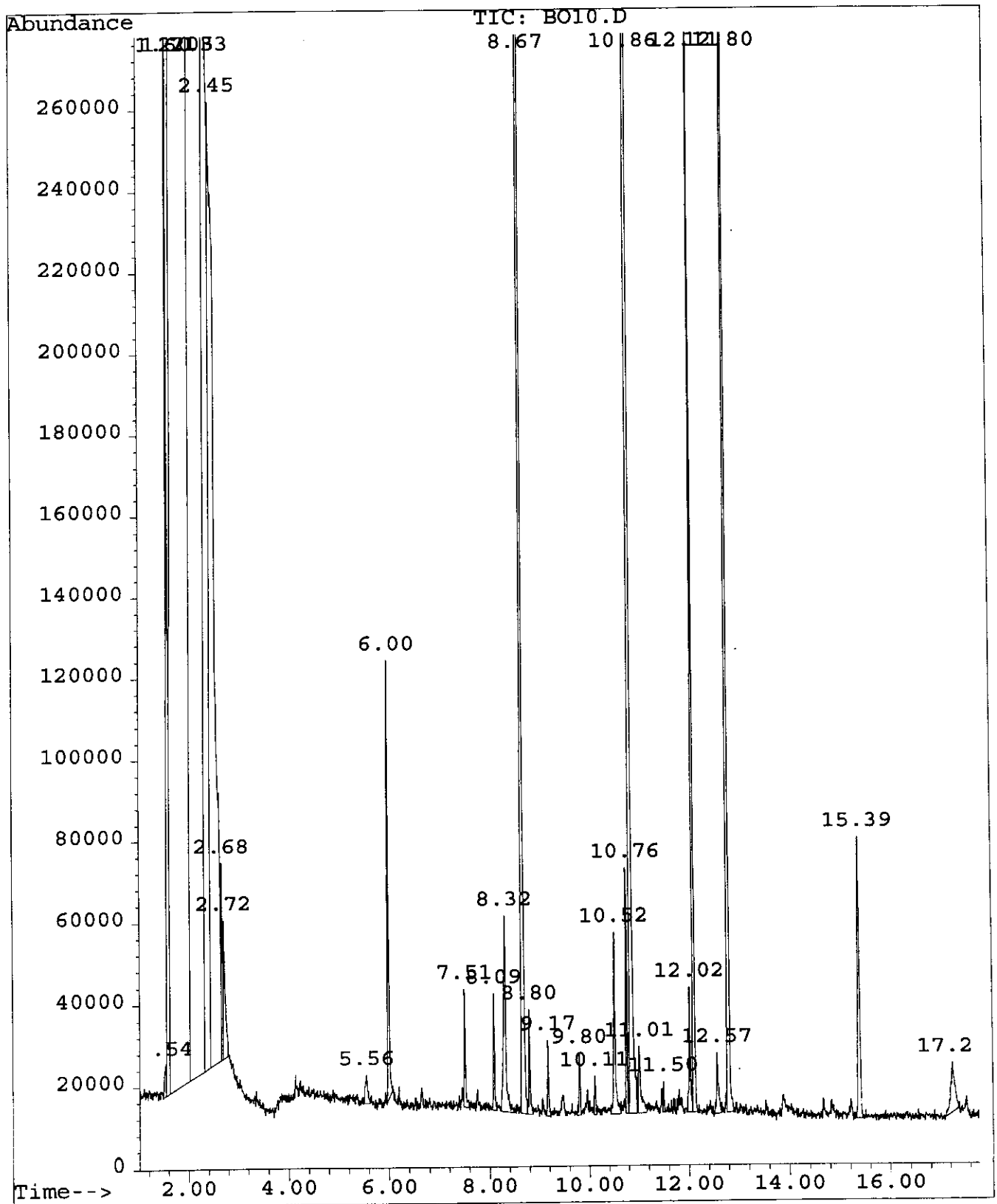
File : C:\HPCHEM\1\DATA\BO4.D
 Operator : toth
 Acquired : 27 Jun 100 10:49 am using AcqMethod BOR
 Instrument : GC/MS
 Sample Name: B579, párhuzamos
 Misc Info : SPME, 40 fok 10p, 2p, bor.m
 Vial Number: 1



Teljes ionáram kromatogramm a B 579 törzs fermentációját követően mustban

7. sz. melléklet

File : C:\HPCHEM\1\DATA\BO10.D
 Operator : toth
 Acquired : 28 Jun 100 10:21 am using AcqMethod BOR
 Instrument : GC/MS
 Sample Name: B579 SeR-2 párhuzamos
 Misc Info : SPME 40 fok, 10p,2p, bor.m
 Vial Number: 1



Teljes ionáram kromatogramm a B 579 Se^R-2 törzs fermentációját követően mustban

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm mindazok segítségét, akik támogatásukkal lehetővé tették számomra, hogy doktori disszertációm elkészüljön.

Elsősorban köszönöm témavezetőm, dr. Maráz Anna professzor asszony segítségét, értékes útmutatását és tanácsait a kísérletes munka és a dolgozat megírása során.

Köszönöm

- Dr. Magyar Ildikó szakmai útmutatását a borászat területén és a BCE Borászati Tanszék munkatársainak a mikrovinifikációs kísérletekben való közreműködését, segítségét;
- Dr. Markus Marianna és Dr. Boross Ferenc (KÉKI Analitikai Osztály) segítségét, hogy laboratóriumukban lehetővé tették a munkához szükséges GC-MS aromavizsgálatok kivitelezését;
- Dr. Peter Raspor professzor úrnak (Ljubljana Egyetem, Biotechnológia Tanszék), hogy lehetőséget biztosított számomra tanszékén ösztöndíjasként biofermentoros vizsgálatok elvégzésére;
- Dr. Hansjörg Prillinger professzor úrnak (Institut für Angewandte Mikrobiologie, Univ. für Bodenkultur, Bécs), hogy laboratóriumában ösztöndíjasként gyakorlatot szerezhettem élesztőgombák molekuláris identifikálási technikáiban.

Köszönettel tartozom továbbá közvetlen kollegáimnak támogatásukért, elsősorban Nagy Katalin technikusnak és Simonics Tibor doktorandusz társamnak a laboratóriumi munkák során való együttműködésükért, illetve Dr. Dlauchy Dénesnek a molekuláris vizsgálatok és azok kiértékeléséhez nyújtott értékes tanácsaiért.

Végül szeretném megköszönöm családom kitartó türelmét, amellyel nagy segítségemre voltak a dolgozat elkészítésében és Dr. Lovas István akadémikus professzor kedves és hatékony támogatását.