

# **DOKTORI ÉRTEKEZÉS**

## **A hazai tejtermékekből származó élesztőgombák jellemzése hagyományos és molekuláris módszerekkel**

Vasdinyei Rita

Budapest, 2005

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Élelmiszertudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Élelmiszertudományok

**vezetője:** Dr. Fekete András  
egyetemi tanár  
Budapesti Corvinus Egyetem

**Témavezető:** Dr. Deák Tibor  
egyetemi tanár  
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék  
Élelmiszertudományi Kar  
Budapesti Corvinus Egyetem

### **A doktori iskola- és témavezető jóváhagyó aláírása:**

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

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
A témavezető jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Doktori Tanács 2004. november 30-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló bizottságot jelölte ki:**

**BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:**

**Elnöke:**                    **Farkas József, MHAS,**  
Budapesti Corvinus Egyetem

**Tagjai:**

Pótelnöke:    **1. Kosáry Judit, DSc,**  
                         Budapesti Corvinus Egyetem  
                         **2. Rezessyné Szabó Judit, PhD,**  
                         Budapesti Corvinus Egyetem  
                         **3. Beczner Judit, CSc,**  
                         Központi Élelmiszertudományi Kutatóintézet  
                         **4. Vágvölgyi Csaba, CSc,**  
                         Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológia Tsz.

Póttagjai:    1. Nyeste László, DSc,  
                         Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem  
                         2. Magyar Ildikó, PhD,  
                         Budapesti Corvinus Egyetem

**Opponensei: 1. Szigeti Jenő, DSc,**  
                         Nyugat-Magyarországi Egyetem, Élelmiszertudományi Intézet  
                         **2. Halász Anna, DSc,**  
                         Központi Élelmiszertudományi Kutatóintézet

Pótopponensei:    1. Lehoczkiné Tornai Judit, CSc,  
                         Budapesti Corvinus Egyetem  
                         2. Kucsera Judit, CSc,  
                         Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológia Tsz.

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tartalomjegyzék .....                                                                                      | 4  |
| 1. BEVEZETÉS .....                                                                                         | 8  |
| 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....                                                                               | 11 |
| 2.1 Tejtermékekben előforduló élesztőgombák .....                                                          | 11 |
| 2.1.1. A tejre és tejtermékekre vonatkozó higiéniai és<br>mikrobiológiai előírások .....                   | 12 |
| 2.1.2. A tejtermékekben található, fehérje- vagy zsírbontó tulajdonsággal<br>rendelkező élesztőfajok ..... | 14 |
| 2.1.2.1. <i>Debaryomyces hansenii</i> .....                                                                | 14 |
| 2.1.2.2. <i>Geotrichum candidum</i> .....                                                                  | 15 |
| 2.1.2.3. <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....                                                              | 15 |
| 2.1.2.4. <i>Trichosporon moniliforme</i> .....                                                             | 15 |
| 2.1.2.5. <i>Yarrowia lipolytica</i> .....                                                                  | 16 |
| 2.2. Táptalajok élesztőgombák tejtermékekből való izolálásához és számlálásához .....                      | 16 |
| 2.3. Hagyományos módszereken alapuló identifikálás .....                                                   | 17 |
| 2.3.1. Egyszerűsített identifikációs módszerek .....                                                       | 17 |
| 2.4. Molekuláris módszereken alapuló identifikálás .....                                                   | 22 |
| 2.4.1. DNS homológia eljárás .....                                                                         | 22 |
| 2.4.2. Restrikciós töredékosszúság .....                                                                   | 22 |
| 2.4.3. Kariotipizálás .....                                                                                | 23 |
| 2.4.3. Polimeráz láncreakció (PCR) .....                                                                   | 26 |
| 2.4.4. PCR-ribotipizálás .....                                                                             | 28 |
| 2.4.5. Random amplifikált polimorfikus DNS-PCR (RAPD-PCR) és a<br>microsatellite-PCR módszerek .....       | 29 |
| 2.4.6. Nukleinsav szekvenálás .....                                                                        | 30 |
| 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....                                                                              | 31 |
| 3.1. Anyagok .....                                                                                         | 31 |
| 3.1.1. Tejipari minták .....                                                                               | 31 |
| 3.1.2. Referencia élesztőtörzsek .....                                                                     | 32 |
| 3.1.3. Csirkehúsból származó izolátumok .....                                                              | 33 |
| 3.1.4. Fiziológiai tápoldatok és táptalajok .....                                                          | 33 |
| 3.1.5. Molekuláris biológiai munkához felhasznált anyagok .....                                            | 38 |
| 3.1.6. Restrikciós enzimek, primerek, polimeráz, eszközök, műszerek .....                                  | 40 |

|                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. Módszerek .....                                                                                                                             | 41 |
| 3.2.1. Sajtminák előállítása .....                                                                                                               | 41 |
| 3.2.2. Telepszámlálás .....                                                                                                                      | 41 |
| 3.2.3. Táptalajok összehasonlítása .....                                                                                                         | 42 |
| 3.2.4. Élesztőtörzsek izolálása .....                                                                                                            | 42 |
| 3.2.5. Élesztőtörzsek fenntartása .....                                                                                                          | 42 |
| 3.2.6. A tejtermékekből származó élesztőtörzsek egyszerűsített<br>identifikációs módszerrel történő identifikálása .....                         | 42 |
| 3.2.7. A csirkehúsból származó izolátumok jellemzésére használt módszerek .....                                                                  | 43 |
| 3.2.8. Kromoszómákat tartalmazó agaróz blokk készítése .....                                                                                     | 46 |
| 3.2.9. Kariotipizálás .....                                                                                                                      | 46 |
| 3.2.10. DNS izolálása .....                                                                                                                      | 47 |
| 3.2.11. A Random Amplified Polimorphism DNA (RAPD-PCR) és a<br>microsatellite-PCR paraméterei .....                                              | 47 |
| 3.2.12. A 18S rDNS és az azzal határos ITS1 részek<br>megsokszorozásához használt polimeráz láncreakció paraméterei .....                        | 48 |
| 3.2.13. Az amplikonok enzimes hasításának paraméterei .....                                                                                      | 48 |
| 3.2.14. Gélelektroforézis és gélkiértékelés .....                                                                                                | 48 |
| 3.2.15. A szekvenálathoz használt 26S rDNS, a vele szomszédos ITS2<br>szakasz és az 5,8 rDNS megsokszorozásának paraméterei .....                | 49 |
| 4. EREDMÉNYEK .....                                                                                                                              | 50 |
| 4.1. Élesztők izolálására szolgáló táptalajok összehasonlítása .....                                                                             | 50 |
| 4.2. Élesztőizolátumok gyűjtése különféle hazai tejtermékekből .....                                                                             | 57 |
| 4.3. A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása hagyományos<br>módszerekkel, az egyszerűsített identifikációs rendszer (SIM) szerint ..... | 59 |
| 4.4. A <i>Geotrichum candidum</i> élesztőtörzsek kariotipizálása .....                                                                           | 67 |
| 4.5. Hazai tejtermékekből származó élesztőfajok- és törzsek<br>azonosítása és összehasonlítása molekuláris módszerekkel .....                    | 68 |
| 4.5.1. A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása<br>ribotipizálás segítségével .....                                                      | 68 |
| 4.5.1.1. A tejtermékekben előforduló élesztőfajok referenciatörzseinek<br>ribotípusai és molekuláris adatbankja .....                            | 68 |
| 4.5.1.2. A tejtermékekből származó izolátumok ribotipizálása és<br>azonosításuk a molekuláris adatbank segítségével .....                        | 71 |

|                                                                                                                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5.2. A <i>Debaryomyces hansenii</i> , a <i>Geotrichum candidum</i> és a <i>Yarrowia lipolytica</i> fajokba tartozó izolátumok törzsi szinten történő megkülönböztetése RAPD-PCR és microsatellite-PCR módszerekkel ..... | 73 |
| 4.5.2.1. A <i>Debaryomyces hansenii</i> törzsek elkülönítése .....                                                                                                                                                         | 73 |
| 4.5.2.2. <i>Geotrichum candidum</i> törzsek összehasonlítása.....                                                                                                                                                          | 76 |
| 4.5.2.3. A <i>Yarrowia lipolytica</i> törzsek vizsgálata .....                                                                                                                                                             | 80 |
| 4.6. A tejtermékekből származó <i>Yarrowia lipolytica</i> izolátumok összehasonlítása baromfihúsból származó izolátumokkal .....                                                                                           | 82 |
| 4.1.1. <i>Yarrowia lipolytica</i> -tól eltérő izolátumok jellemzése.....                                                                                                                                                   | 84 |
| 4.6.2. Új élesztőfaj, a <i>Candida galli</i> kimutatása.....                                                                                                                                                               | 87 |
| 5. KÖVETKEZTETÉSEK.....                                                                                                                                                                                                    | 88 |
| 5.1. Táptalajok összehasonlítása élesztők tejtermékekből történő izolálására való alkalmasságuk szempontjából .....                                                                                                        | 88 |
| 5.2. Az izolátumok azonosítása hagyományos módon.....                                                                                                                                                                      | 89 |
| 5.3. <i>Geotrichum candidum</i> élesztőtörzsek kariotipizálása .....                                                                                                                                                       | 90 |
| 5.4. A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása ribotipizálás segítségével 91                                                                                                                                        |    |
| 5.5. A leggyakoribb élesztőfajok törzseinek megkülönböztetése RAPD-PCR és microsatellite-PCR módszerekkel .....                                                                                                            | 91 |
| 5.6. A tejtermékekből származó <i>Yarrowia lipolytica</i> izolátumok összehasonlítása baromfihúsból származó izolátumokkal .....                                                                                           | 92 |
| 6. ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                                                                                                                                                     | 94 |
| 6.1. Szelektív táptalajok összehasonlítása az élesztőizolátumok gyűjtéséhez.....                                                                                                                                           | 94 |
| 6.2. A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása hagyományos módszerrel .....                                                                                                                                         | 95 |
| 6.3. A <i>Geotrichum candidum</i> törzsek összehasonlítása kariotipizálással .....                                                                                                                                         | 95 |
| 6.4. A tejtermékekből származó élesztőfajok és törzsek azonosítása és összehasonlítása molekuláris gyorsmódszerek segítségével.....                                                                                        | 96 |
| 6.4.1. Az izolátumok faji szintű azonosítása ribotipizálás alkalmazásával .....                                                                                                                                            | 96 |
| 6.4.1. Az izolátumok törzsi szintű összehasonlítása RAPD-PCR és microsatellite-PCR segítségével.....                                                                                                                       | 96 |
| 6.4.2. A <i>Yarrowia lipolytica</i> törzsek összehasonlítása baromfihúsból származó izolátumokkal .....                                                                                                                    | 97 |
| 6.5. A vizsgálatok jelentősége .....                                                                                                                                                                                       | 98 |

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7. SUMMARY .....                                                                                                                           | 99  |
| 7.1. Comparison of selective media for the isolation of yeasts .....                                                                       | 99  |
| 7.2. Identification of yeasts originating from dairy products based<br>on traditional tests.....                                           | 100 |
| 7.3. Comparison of <i>Geotrichum candidum</i> strains by karyotyping.....                                                                  | 100 |
| 7.4. Rapid molecular methods used for the identification and comparison<br>of yeasts species and strains occurring in dairy products ..... | 101 |
| 7.4.1. Species level identification of isolates by ribotyping .....                                                                        | 101 |
| 7.4.2. Comparison of isolates at strain-level using RAPD-PCR and<br>microsatellite-PCR.....                                                | 101 |
| 7.4.3. Comparison of <i>Yarrowia lipolytica</i> strains to isolates originating<br>from poultry.....                                       | 102 |
| 7.5. The significance of investigations .....                                                                                              | 102 |
| 8. IRODALOMJEGYZÉK .....                                                                                                                   | 104 |
| 9. PUBLIKÁCIÓS LISTA .....                                                                                                                 | 114 |

## 1. BEVEZETÉS:

A tejsavbaktériumok és más baktériumok jelentős szerepe a tejtermékek készítésében jól ismert mindenki számára. Kevésbé tudott azonban, hogy mellettük a legtöbb esetben élesztőgombák is megtalálhatók a tejtermékekben. A kefir és a kumisz erjesztésén kívül, mely tejsavbaktériumok és élesztők mesterséges hozzáadásával történik, a tejtermékekbe az élesztőgombák természetes úton, a környezetből jutnak. Az utóbbi években egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az élesztőgombák szerepének az egyes sajtfélék érlelésében. Elsősorban azért, hogy a tejsavbontásukkal a termék pH-ját megemelik, elősegítik egy savérzékeny baktériumbióta megtelepedését. Másodsorban fehérje- és zsírbontó képességüknek köszönhetően, aromaanyagok prekursorait termelik, jelentősen hozzájárulva ezzel a sajtok érzékszervi tulajdonságainak alakításához (Romano et al., 1996). A *Geotrichum candidum* élesztőfajnak az a képessége már jól ismert, hogy számos kéntartalmú vegyületet termel aminosav prekursorokból, aminek többek között az egyes sajtfélék ízének és illatának változatossága köszönhető (Berger et al. 1999; Demarigny et al. 2000). Élesztőgombák gyakran szennyezik a tejtermékek felületét anélkül, hogy azok romlását okoznák. Nagymértékű elszaporodásuk azonban az élelmiszer érzékszervi tulajdonságainak megváltozását okozhatja, a terméket fogyasztásra alkalmatlanná teheti, nagy gazdasági károkat okozva ezzel a tejiparnak. Leggyakoribb élesztők okozta romlási jelenségek a gázos puffadás, az élesztőíz és más ízváltozások, az elszíneződés és a termék konzisztenciájának megváltozása (Fleet, 1990; Viljoen and Greyling, 1995; Deák és Beuchat, 1996; Jakobsen and Narvhus, 1996).

A tejtermékek élesztőbiótájának összetételét azok a sajátos ökológiai viszonyok határozzák meg, amelyeket ez az élelmiszertípus nyújt. A tejipari készítményekre a viszonylag kis pH, a nagy sókoncentráció és az alacsony tárolási hőmérséklet igény jellemző, amely tulajdonságok az ezt tolerálni képes élesztőfajok szaporodását segítik elő. Előnyt élveznek a fehérje- és zsírbontó képességű élesztők is. Ilyen élesztőfajok a *Debaryomyces hansenii*, a *Kluyveromyces marxianus*, a *Yarrowia lipolytica*, a *Trichosporon moniliforme* és a *Geotrichum candidum* (Deák és Beuchat, 1996).

Az egyes tejtermékfélék élesztőpopuláció-összetételének vizsgálatához nélkülözhetetlen az izolátumok meghatározása. A hagyományos azonosítási módszer morfológiai, élettani és biokémiai tesztet alkalmaz élesztők identifikálására, ez az eljárás azonban anyag-, munka- és időigényes. Léteznek gyorsabb, szintén fiziológiai vizsgálatokon alapuló módszerek. Gyárilag elkészített identifikációs rendszerek (API 20C AUX system, API ID 32 C system, Biolog system; Heard and Fleet, 1990, Praphailong et al. 1997) és

egyszerűsített identifikálási rendszerek (Deák and Beuchat, 1987) segítségével valóban megkönnyíthető az izolátumok azonosítása, legtöbbjükét azonban az élesztők meghatározott csoportjának identifikálására fejlesztették ki, így téves eredmény adhatnak, ha az azonosítani kívánt izolátumok között nem ebbe a csoportba tartozó élesztő is előfordul.

A molekuláris biológia nagymértékű fejlődése az utóbbi években új lehetőséget nyitott az élesztők identifikálására is. Számos molekuláris módszer alkalmas a különféle élelmiszerfajtákból származó élesztők gyors identifikálására is. Az e célra leggyakrabban használt molekuláris módszerek a DNS homológia eljárás (Kurtzman, 1984), a restrikciós töredék hossz (RFLP) módszer (Bostock et al, 1993; Fernandez-Espinar et al, 2001; Martinez et al, 1995; Querol et al, 1994; Querol and Ramon, 1996) az elektroforézises kariotipizálás pulzáló elektromos mezőben (PFGE) (Asakura et al, 1991; Johnston et al, 1988, Naumov et al, 1993; Sor és Fukuhara, 1989; Tornai-Lehoczki és Dlačny, 1996; 2000; Vaughan-Martini et al, 1993; Versavaud és Hallet, 1995; Vezinhet et al, 1990) a polimeráz láncreakción alapuló technikák közül a véletlenszerűen megsokszorozott DNS sokféleség (RAPD-PCR) módszer (Andrighetto et al., 2000; Baleiras Couto et al, 1994; 1995; Prillinger et al, 1999), a PCR-ribotipizálás (Caruso és munkatársai 2002; Deák et al., 2000; Tornai-Lehoczki és Dlačny, 2000;) és a riboszóma RNS szekvenálás (Cappa és Cocconcelli, 2001; Fell et al, 2000; Kurtzman és Blanz, 1998)

## **Célkitűzések:**

Világszerte megnőtt az érdeklődés az élelmiszerekben, így a tejtermékekben előforduló élesztőgombák tevékenysége iránt. A hazai adatok száma azonban igen kicsi, ezért elsődleges célul a Magyarországon gyártott készítményekben megtalálható élesztőfajok hagyományos és molekuláris módszerekkel történő alapos, széles körű vizsgálatát tűztem ki.

A tejtermékekben az élesztők más mikroorganizmusokkal együtt, vegyes tenyészetben fordulnak elő. Az élesztőizolátumok gyűjtéséhez olyan táptalajokra van szükség, amelyek visszaszorítják a baktériumok és a penészgombák szaporodását és segítik a mintában megtalálható összes élesztő fejlődését. Vizsgálataim legelső lépéseként az élesztőgombák tejtermékekből való izolálásához kerestem a legalkalmasabb, ezeknek a kritériumoknak leginkább megfelelő táptalajt az irodalomban leírt, az élesztők tenyésztésére használt tápközegek közül.

Kutatómunkám további célja az alkalmazott hagyományos és molekuláris módszerek összehasonlítása volt az élesztőizolátumok faji, illetve törzsi szinten történő azonosítására való alkalmasságuk szempontjából. A kapott eredmények nemcsak a további kutatómunkában lehetnek hasznosak, hanem nagy segítséget jelenthetnek az élelmiszeripar számára is, mivel a leghatékonyabbnak talált eljárások segítségével eredményesen kimutathatja az élesztős romlás veszélyét, annak okozóit azonosíthatja, valamint a romlás bekövetkezését meg is előzheti.

Ezenkívül célom volt még összefüggés keresése a vizsgált tejtermékek gyártója illetve a tejterméktípusok és a törzsi szintű azonosításra legmegfelelőbbnek talált módszer felhasználásával kapott eredmények között.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS:

### 2.1 Tejtermékekben előforduló élesztőgombák

Az élesztőgombák jelentősége a tejtermékek gyártása során kettős. Bizonyos tejtermékek erjesztésekor és sajtok érlelésekor a szerepük nélkülözhetetlen. Ugyanakkor túlságosan elszaporodva a tej és a tejtermékek romlását okozhatják. Változatos jellegük ellenére a tejtermékek sajátos ökológiai viszonyokat nyújthatnak. A viszonylag kis pH, a nagy sókoncentráció, az alacsony hőmérsékleten való tárolás azok a főbb környezeti tényezők, melyek közt a laktózt, a tejsavat tápanyagként hasznosítani képes, fehérje- vagy zsírbontó mikroorganizmusok szaporodhatnak. Ilyen élesztőgombák a *Debaryomyces hansenii*, a *Kluyveromyces marxianus*, a *Yarrowia lipolytica*, a *Trichosporon moniliforme* és a *Geotrichum candidum* (Deák, 1998).

A nyers tej számos élesztőgomba fajt tartalmazhat, a kezelése során alkalmazott higiénitól függően. Hűtött körülmények között való tárolása a pszichotróf fajok elszaporodásának kedvez. A pasztörözött, kereskedelmi forgalomban kapható tejben található élesztők már a másodlagos szennyeződés eredményei (Deák és Beuchat, 1996).

A tejtermékek közül a sajtokon kívül a kefir és a kumisz érlelésében játszanak az élesztők pozitív szerepet. Ez a két terméktípus tejsavas-élesztős erjesztésen megy keresztül. A kefirszemcsékben a tejsavbaktériumok és az élesztők szoros szimbiózisban élnek. Az utóbbiakat a laktózerjesztő *Kluyveromyces lactis* képviseli, de nem laktózerjesztő fajok (*Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*) is előfordulnak (Deák, 1998).

A nagy zsírtartalmú tejtermékek, így a vaj romlását is okozhatják élesztők, legfőképpen a zsírbontó tulajdonsággal rendelkező *Candida*, *Rhodotorula* és *Cryptococcus* fajok, a termék ízbeli változását okozva (Fleet, 1992).

A manapság nagyon népszerű tejtermék, a joghurt, amely starterkultúráként csak tejsavbaktériumokat tartalmaz és pasztörizált, gyakran tartalmaz élesztőket, ami a termék romlását okozhatja. Legfőképpen a hozzáadott gyümölccsel vagy ízesítőanyagokkal nő meg az élesztő termékbe való bekerülésének a kockázata (Deák és Beuchat, 1996). Rohm és munkatársai (1992) joghurt vizsgálatokor nagyszámban találtak élesztőket, amelyeket *Candida inconspicua*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilopsis*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Metschnikowia reukauffii*, *Pichia guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Torulaspora delbrueckii*, *Trichosporon beigeli* és *Yarrowia lipolytica* fajokként azonosítottak.

Élesztők a sajtok közül elsősorban a lágy sajtok érlelésében vesznek részt, sokszor a beoltott penészgombákkal együtt (pl. a Camembert és a Roquefort sajtokban). Ezekben a *Pichia fermentans*, a *Debaryomyces hansenii* és a *Geotrichum candidum* fordul elő gyakran (Deák, 1998). Besancon és munkatársai (1992) szerint a Roquefort sajt felületén található élesztőflórában a *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*) és a *Kluyveromyces lactis* (*Candida sphaerica*) voltak a leggyakrabban előforduló élesztőfajok. Roostita és Fleet (1996) Camembert és egy roquefort típusú sajt vizsgálatokor legnagyobb számban a *Debaryomyces hansenii*, *Candida catenulata*, *Candida kefyr*, *Candida intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus* és a *Kluyveromyces marxianus* képviselőit találta a sajtokban. Tempel és Jakobsen (1998) a Danablu sajt érését kísérték figyelemmel, amely során 166 élesztőizolátumot gyűjtöttek össze. A leggyakrabban előforduló élesztőfajok a *Candida famata* és a *Candida catenulata* voltak. Különböző, Ausztriából, Dániából, Franciaországból, Németországból és Olaszországból származó sajt vizsgálatokor Prillinger és munkatársai (1999) az általuk gyűjtött és azonosított 76 izolátum közül a legtöbb a *Debaryomyces hansenii*, a *Geotrichum candidum*, az *Issatchenkia orientalis*, a *Kluyveromyces lactis*, a *Kluyveromyces marxianus*, a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Yarrowia lipolytica* és a *Candida catenulata* fajba volt sorolható.

A tejtermékben előforduló élesztők sokfélesége ellenére egy-egy adott termékben a bennük megtalálható élesztőfajok közül csak egy vagy néhány válik dominánssá és a romlás jellegzetes okozójává, amellyel a tejfeldolgozó üzemeknek igen nagy veszteséget okozhatnak (Deák, 1998).

#### **2.1.1. A tejure és tejtermékekre vonatkozó higiéniai és mikrobiológiai előírások**

A tejtermékek élesztőszáma nem rendeletben és jogszabályban meghatározott érték. A Magyar Élelmiszerkönyv (2004), valamint a Földművelési és Vidékfejlesztési Minisztérium és az Egészségügyi, Szociális és Családügyi Minisztérium tejure és tejalapú termékek előállításának, forgalomba hozatalának élelmiszer-higiéniai feltételeire vonatkozó 1/2003 számú együttes rendelete nem találhatunk élesztőkre vonatkozó előírásokat, ezekben a tej alapú termékek gyártásához illetve a fogyasztásra felhasznált nyers tejure (tehéntej, juhtej, kecsketej) (1. táblázat) és a termékekre vonatkozó higiéniai és mikrobiológiai követelmények a mikrobaszámra, a szomatikus sejtszámra, a gátlóanyag-tartalomra, a patogén mikroorganizmusokra és a toxinjaikra, illetve a gyenge higiénit jelző mikroorganizmusokra (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) korlátozódik.

1. táblázat: A közvetlen fogyasztásra és a tej alapú termékek gyártásához felhasznált nyers tejjel vonatkozó higiéniai és mikrobiológiai követelmények  
(Magyar Élelmiszerkönyv, 2-51/01)

| Jellemző                                                       | Termelői nyers tehéntej közvetlen fogyasztásra                     | Termelői nyers tej ipari feldolgozásra |                         |                  |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|------------------|
|                                                                |                                                                    | Tehéntej                               | Juhtej                  | Kecsquetej       |
| Mikrobaszám, cfu/cm <sup>3</sup> (a)                           | ≤ 50 000                                                           | ≤ 100 000                              | ≤ 1 500 000             | ≤ 1 500 000      |
| Szomatikus sejtszám, sejt/cm <sup>3</sup> (a)                  | ≤ 400 000                                                          | ≤ 400 000                              |                         |                  |
| Gátlóanyag (b)                                                 | Nem mutatható ki                                                   | Nem mutatható ki                       | Nem mutatható ki        | Nem mutatható ki |
| <i>Staphylococcus aureus</i> -szám, bakt/cm <sup>3</sup> (c,d) | n=5, c=2, m=100, M=500                                             | n=5, c=2, m=500, M=2000                | n=5, c=2, m=500, M=2000 |                  |
| <i>Salmonella</i> ssp., bakt/cm <sup>3</sup>                   | n=5, 25 gr-ban negatív                                             | –                                      |                         |                  |
| Egyéb kórokozó mikroorganizmusok és/vagy toxinjaik             | Nem mutatható ki a fogyasztó egészségét veszélyeztető mennyiségben | –                                      |                         |                  |

(a) A hatályos rendelet szerint számított mértani átlag alapján, havonta legalább 3 vizsgálattal

(b) Az élelmezés-egészségügyi határértékeket a vonatkozó jogszabályok tartalmazzák

(c) A vizsgálatot azokból a nyerstehéntej-tételekből kell elvégezni, amelyekből hőkezelés nélkül állítanak elő tejalapú terméket

(d) n: a mintát alkotó elemi minták száma

m: mikrobaszám-küszöbérték, az eredmény akkor megfelelő, ha a mikrobaszám egyetlen mintában sem több, mint „m”

M: a mikrobaszám maximális értéke, az eredmény akkor nem megfelelő, ha a mintaegységben a mikrobaszám „M” vagy több

c: azon mintaegységek száma, amelyekben a mikrobaszám „m” és „M” között lehet. A minta akkor elfogadható, ha a többi mintaegység mikrobaszáma ≤ „m”-nél

Az FVM-ESzCsM 1/2003 (I/8) együttes rendelete 1. számú mellékletében rögzített hőkezelt fogyasztói tej és a tej alapú termékek előállításához használt hőkezelt tej minőségének élelmiszer-higiéniai követelményeit rögzítő rendeletek szerint mikrobaszámuk közvetlenül a második hőkezelés előtt 30 °C-on nem haladhatja meg a 100 cfu/cm<sup>3</sup> értéket. A tejtermékekben a rendeletben meghatározott patogén mikroorganizmusokon kívül egyéb patogén mikroorganizmusok sem lehetnek jelen vagy toxinjaik sem lehetnek jelen a termékben a fogyasztó egészségét veszélyeztető mértékben. Ha a termékek mikroorganizmus-tartalma a megengedett határértéket túllépi, azonnal értesíteni kell a belső ellenőrzési rendszer hibaelhárító eljárásait és értesíteni kell az illetékes hatóságokat.

Az élesztőgombák ugyan nem okoznak élelmiszer-mérgezést vagy fertőzést, a tejfeldolgozó üzemek a minőségbiztosításuk, illetve minőségmegővésük érdekében saját

belátásuk szerint a termékeik mikrobiológiai minőségének belső ellenőrzése részeként elvégezhetik az élesztők számának a meghatározását és elkészíthetik termékeik megengedett élesztőszámára vonatkozó belső előírásokat. Sok esetben szükséges lehet az élesztők faji összetételének meghatározása is, például a starter kultúraként a *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc*-, *Lactococcus*-, és *Acetobacter*- félék mellett még laktózerjesztő élesztőket (*Kluyveromyces marxianus*) és laktózt nem erjesztő élesztőket (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*) is tartalmazó kefir esetében, amikor ezektől az élesztőfajoktól a potenciális romlást okozókat lényeges megkülönböztetni. Hasonló a helyzet a már említett lágy sajtokban előforduló néhány élesztőkfajnál is, amelyek pozitívan járulnak hozzá a termék íz-, és illatanyagához. A tejtermékek faji összetételének meghatározása mellett - az élesztőszám meghatározáshoz hasonlóan szintén nincs jogszabályokban rögzítve - az egyes tejfeldolgozó üzemek saját belátásuk szerint dönthetnek.

#### **2.1.2. A tejtermékekben található, fehérje- vagy zsírbontó tulajdonsággal rendelkező élesztőfajok**

##### **2.1.2.1. *Debaryomyces hansenii***

A *Debaryomyces hansenii* élesztőfaj telepeinek a színe fehértől a vajsínig változhat. Vegetatív szaporodásuk sarjadzással történik. Álhifájuk általában hiányzik, de időnként előfordulhat. Ivaros szaporodásuk során a konjugáció nemcsak a különálló sejtek között, hanem az anyasejt és a sarjsejt között is létrejöhet (pedogámia), ilyenkor a sarj nem különül el az anyasejttől, ami sporangiummá alakul. Az aszkuszai 1-2 érdes, gömb alakú spórát tartalmaznak. Sok spóra jelenlétében a telep színe barnává változik. Anamorf alakja a *Candida famata* (Nakase et al., 1998, Barnett et al. 2000). Számos élettani tulajdonsága változó, ezért meghatározni nem könnyű. Nagy cukor- illetve sótartalmú közegben (50 % glükóz, 10 % NaCl) viszonylag könnyen szaporodik. A *Debaryomyces hansenii* kiemelkedően gyakori és az élelmiszerek széles körében előforduló élesztő, különösképpen pácolt, sózott, érelt húskészítményekben, erjesztett tejtermékekben és savanyúságokban fordul elő (Deák, 1998).

##### **2.1.2.2. *Geotrichum candidum***

A *Geotrichum candidum* vegetatív szaporodási módja a hifák artrokonídiumokra hasadásával történik, sarjadzó sejtjei nincsenek. A spóráképzés két hifafonal összeolvadásával történik, amelyet az oldalágak anasztomózisa előz meg és gametangiumokra emlékeztető képződmény is keletkezik. A kolóniái fehérek, nem nyálkásak, bolyhosak. Valódi hifái párhuzamosan növekednek, gyakran két irányba elágaznak, a főág szélesebb (7-14  $\mu\text{m}$ ), a mellékág keskenyebb (2,5-4  $\mu\text{m}$ ) és hamar feldarabolódik kocka alakú artrokonídiumokra. A gametangiumok a hifák oldalán fejlődnek ki. Az aszkuszok majdnem gömbölyűek és egy aszkospórát tartalmaznak. Az aszkospórák elipszoid alakúak, halvány aranybarna színűek, tüskés belső fallal és asszimetrikus exospóriummal rendelkeznek. A *Geotrichum candidum* heterotalliás élesztőfaj. Teleomorf alakja a *Galactomyces geotrichum* (Hoog et al, 1998, Barnett et al. 2000).

#### **2.1.2.3. *Kluyveromyces marxianus***

A *Kluyveromyces marxianus* sejtjei gömb, elipszoid, vagy hengeres alakúak, amelyek egymagukban, párokban vagy láncokká kapcsolódva helyezkednek el. A telepek vajszerűek, fényesek, színük krémszíntől a barnáig változhat, ritkán rózsaszínes lehet a pulcherrimin termelésnek köszönhetően. A fejletlentől a nagymértékben elágazóig minden típusú álhifa előfordulhat, amelyeken kevés blasztospóra is kifejlődhet. Az aszkuszok képződését a haploid sejtek, vagy a sarjsejt és az anyasejt konjugációja előzi meg, vagy közvetlenül a diploid sejtekből is növekedhetnek. 1-2 aszkospóra képződik bennük, amelyek alakja lehet gömb, ellipszis, vagy vese alakú. A spórázó tenyészetek homotalliásak. A spórák képződésük után gyorsan kiszabadulnak az aszkuszból és agglutinálódnak (Lachance, 1998, Barnett et al. 2000). A legtöbb *Kluyveromyces marxianus* törzs jól spórázik, erősen spórázó tenyészetben piros árnyalatú telepet képez. Anamorf alakja a *Candida kefyr*. A *Kluyveromyces marxianus* élesztőfaj elsődleges szerepet játszik joghurtok romlásában (Deák, 1998).

#### **2.1.2.4. *Trichosporon moniliforme***

A *Trichosporon moniliforme* telepei krémszínűek, először nyálkásak, később gyakran szárazak. Vegetatív szaporodásuk sarjadzással vagy hasadással történik. Valódi hifái vannak, amelyek csúcsán vagy oldalán sarjadzó sejtek (blasztokonídiumok, 2,5 x 4  $\mu\text{m}$  nagyságúak) képződnek. A válaszfallal rendelkező valódi hifák elipszoid alakú, 2  $\mu\text{m}$  széles artrokonídiumokra hasadnak (Guého et al., 1998, Barnett et al. 2000). Ivaros szaporodási módja nincsen. Gyakori élelmiszerekben, jelentős romlásokozó. Talajban, szennyvizekben is

sokszor előfordul. Zöldség- és gyümölcsfeldolgozó üzemekben a nem megfelelő higiénia jelzői, a *Geotrichum* fajokkal együtt nagy számban mutathatók ki a nem tiszta felületekről, gépekről (Deák, 1998).

#### **2.1.2.5. *Yarrowia lipolytica***

A *Yarrowia lipolytica* egy aszkomiceta élesztőfaj, amely Kurtzman és Robnett (1998) szerint a 26S rDNS D1/D2 doménjének a szekvenciájára alapozva önálló pozíciót foglal el a filogenetikai törzsfán. Ivartalan szaporodása multilaterális sarjadzással történik. Néha artrokonídiumot is képez. Sejtjei gömb vagy elipszoid alakúak, gyakran megnyúltak. Valódi hifákat és álhifákat hoz létre, a valódi hifákat középen elhelyezkedő mikropórussal rendelkező szeptumok taglalják. Heterotallias faj. Az aszkuszok általában a diploid hifákból erednek és 1-4 aszkospórát képeznek. A *Yarrowia lipolytica* spóraelakja - amely lehet gömb, kalap, félgömb, vagy időnként szögletes alakú - stabilis tulajdonság (Kurtzman, 1998, Barnett et al. 2000). Anamorf alakja a *Candida lipolytica*. Az iparban citromsav és adalékanyagok, valamint egysejtfehérje előállítására használják fel. Az élelmiszeriparban a *Lactococcus lactis* tejsavbaktériummal, a *Penicillium roqueforti* penészgombával együtt vesz részt a roquefort sajt előállításában. Élelmiszerekben gyakori, főleg hús- és tejtermékekben fordul elő. A tejtermékekben zsírbontó képességének köszönhetően szaporodhat. A *Yarrowia lipolytica* élesztőfajt más fajokkal együtt szénhidrogénekben való egysejtfehérje termelésre is próbálták felhasználni a 70-es évek elején, azonban ez a hasznosítási mód az olajár robbanás után gazdaságtalanná vált (Deák, 1998).

### **2.2. Táptalajok élesztőgombák tejtermékekből való izolálásához és számlálásához**

Az élesztőgombák élelmiszerekből való izolálására és számlálására alkalmas táptalajnak gátolnia kell a baktériumokat, csökkentenie kell a penészek növekedését, ugyanakkor minden élesztő növekedését elő kell segítenie (King et al, 1986; Fleet, 1990; Deák, 1991; Beuchat, 1993). Több ilyen táptalaj létezik, az összes élelmiszerféle vizsgálatára alkalmas táptalaj azonban az eddigi irodalmi adatok szerint nincs (Deák, 1992; Deák et al, 1998; Beuchat, 1998). Bennük a baktériumok gátlására kloramfenikolt, oxitetraciklint, gentamicint és számos más antibiotikumot használnak. A kloramfenikol hőstabil, a táptalajhoz még autoklávozás előtt hozzáadható, azonban ennek a rákos megbetegedést okozó komponensnek a használata fokozott figyelmet igényel (Beckers és munkatársai, 1986). A

penésztelepek átmérőjének csökkentésére is történtek kísérletek, mivel a penészgombákkal beoltott lágy sajtok (Camembert és Roquefort sajtok) vizsgálata esetén a penészek könnyen benőhetik a táptalajt (Roosita és Fleet, 1996). King és munkatársai (1979) a vizsgálataikhoz a penészgombák visszaszorításához dikloránt és bengálrózsát tettek a táptalajba. A diklorán bengálrózsa klorafenikol (DRBC) táptalaj nagyon hatékonynak bizonyult az élesztők izolálására élelmiszerekből.

Néhány kísérlet már történt élesztőgombák tejtermékekből való izolálására is (Fleet és Mian, 1987, Barioller és Schmidt, 1990, Rohm et al., 1992, Jakobsen és Narvhus, 1996). Welthagen és Viljoen (1997) tíz szelektív táptalajt hasonlított össze élesztőgombák izolálására és számlálására való alkalmasságuk szempontjából. Ők az antibiotikummal kiegészített táptalajokat hatékonyabbnak találták a savanyított táptalajoknál a semleges pH-jú tejtermékekből való élesztőizolálásra, viszont egyformának bizonyultak a savas pH-jú termékekből, például a sajtokból és a joghurtokból történő izolálás szempontjából. Azoknál a sajtoknál, amelyeknél penészeket is használnak az érleléshez, a penészmicéliumok gyakran benővik az élesztőtelepeket (Roosita és Fleet, 1996). Az élesztőknek ezekből a sajtokból történő izolálásához azonban a megfelelő táptalaj kidolgozása még nem történt meg.

### **2.3. Hagyományos módszereken alapuló identifikálás**

A pontos identifikációhoz használt tesztek száma általában 60-90 között változik, a vizsgálatok végrehajtása 2-től 4 hétig tarthat (Deák és Beuchat, 1993). A faji azonosítás számos élettani és biokémiai vizsgálat elvégzését igényli. Ennek köszönhető, hogy ez a módszer rendkívül munkaigényes, tekintélyes szakmai tudást igényel, valamint jelentős időt kell fordítani az elvégzésére. Mindezeket figyelembe véve a módszer nem alkalmazható az élesztőgombák rutinszerű azonosításához. A meghatározás megkönnyítésére különböző gyárilag elkészített identifikációs rendszerek (API 20 C, Uni Yeast Tek, ATB 32 ID és API 32 C) és egyszerűsített identifikációs módszerek készültek.

#### **2.3.1. Egyszerűsített identifikációs módszerek**

Szemben a hagyományos identifikálással, az egyszerűsített identifikációs módszerek előnyét az nyújtja, hogy jóval kevesebb teszt végzendő el az azonosításhoz. Deák és Beuchat (1987) az élelmiszerekben romlást okozó élesztők meghatározására dolgozott ki módszert, amely az elvégzendő tesztek számát 10-15-re csökkentette. Rohm és Lechner (1990) a módszer megbízhatóságát szegényesnek találta, szerintük Deák és Beuchat számos szükséges

próbát nem használt fel a rendszerükben. Deák és Beuchat (1993) újabb rendszert hoztak létre, amely az élelmiszerekben leggyakrabban előforduló élesztőgombák meghatározására alkalmas. Ebben a rendszerben az alkalmazott vizsgálatok száma 30. Közülük az első szakaszban 19 állandó vizsgálatot kell elvégezni, a többi csak kiegészítésre szolgál (Deák, 1998) (2. táblázat).

2. táblázat. Az egyszerűsített identifikáláshoz használt vizsgálatok (Deák, 1998)

| Állandó vizsgálatok     | Kiegészítő vizsgálatok | Alaktani vizsgálatok |
|-------------------------|------------------------|----------------------|
| Ureáz reakció           | <i>Szaporodás :</i>    | Mikroszkópos alak    |
| Cikloheximid-tűrés      | 37 °C-on               | Hifa- álhifa képzés  |
| Glükózerjesztés         | Vitamin nélkül         | Hártyaképzés         |
| <i>Asszimiláció</i>     | 1% ecetsavval          | Telepszín            |
| Cellobióz               | 60% glükózzal          |                      |
| Kadaverin               | 16% konyhasóval        |                      |
| Citromsav               | <i>Asszimiláció :</i>  |                      |
| Eritrit                 | L-arabinóz             |                      |
| Keményítő               | Laktóz                 |                      |
| 2-ketoglükonát          | Ramnóz                 |                      |
| Lizin                   | Szaccharóz             |                      |
| Maltóz                  | Trehalóz               |                      |
| Mannit                  | <i>Erjesztés</i>       |                      |
| Melibióz                | Szacharóz              |                      |
| Galaktóz                | Maltóz                 |                      |
| $\alpha$ -metilglükózid |                        |                      |
| Nitrát                  |                        |                      |
| Raffinóz                |                        |                      |

Először az alap határozókulcs (3. táblázat) hat vizsgálat alapján hét csoportot képez a figyelembe vett 120 élesztőből, majd a hét csoport mindegyikében további határozókulcsok vezetnek az egyes csoportokba tartozó fajok (4.-10. táblázat) azonosításához.

3. táblázat: Alap határozó kulcs

| Jellemző | Pozitív | Negatív |
|----------|---------|---------|
|----------|---------|---------|

|                               |            |            |
|-------------------------------|------------|------------|
| 1. Ureázreakció               | 1. csoport | 2          |
| 2. Nitrát-asszimiláció        | 2. csoport | 3          |
| 3. Eritrit-asszimiláció       | 3. csoport | 4          |
| 4. Szaporodás cikloheximiddel | 5          | 6          |
| 5. Cellobióz-asszimiláció     | 4. csoport | 5. csoport |
| 6. Mannit-asszimiláció        | 6. csoport | 7. csoport |

Az 1. csoportban a pozitív ureáz reakciót adó élesztőket találjuk (4. táblázat).

4. táblázat: Az ureáz pozitív élesztők

| 22 faj, változó ureázreakciót adó nincs köztük |                              |                              |
|------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>Bulleromyces albus</i>                      | <i>Filob. capsuligenum</i>   | <i>Schizo. octosporus</i>    |
| <i>Crypt. albidus</i>                          | <i>F. ella neoformans</i>    | <i>Schizo. pombe</i>         |
| <i>Crypt. curvatus</i>                         | <i>Leucosp. scottii</i>      | <i>Sporid. salmonicolor</i>  |
| <i>Crypt. diffluens</i>                        | <i>Moniliella suaveolens</i> | <i>Sporid. pararoseus</i>    |
| <i>Crypt. humicolus</i>                        | <i>Rhodot. glutinis</i>      | <i>Sporob. roseus</i>        |
| <i>Crypt. laurentii</i>                        | <i>Rhodot. minuta</i>        | <i>Trichosp. moniliforme</i> |
| <i>Cysto. infirmo-miniatum</i>                 | <i>Rhodot. mucilaginosus</i> | <i>Trichosp. pullulans</i>   |
|                                                | <i>Schizo. japonicus</i>     |                              |

Az alap határozó kulcs az élesztők 2. csoportját a nitrátasszimiláció alapján különíti el, ami nagyon állandó tulajdonság (5. táblázat).

5. táblázat: Nitrátot asszimiláló élesztők

| 19 faj, köztük két változó (negatív nitrátasszimiláció esetén a zárójeles számú csoportba tartoznak). |                                   |                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| <i>C. boidinii</i>                                                                                    | <i>C. versatilis</i>              | <i>P. holstii</i>             |
| <i>C. etchellsii</i>                                                                                  | <i>Citero. matritensis</i>        | <i>P. jadinii</i>             |
| <i>C. lactiscondensii</i>                                                                             | <i>Dekkera anomala</i> (4,5)      | <i>P. subpelliculosa</i>      |
| <i>C. magnoliae</i>                                                                                   | <i>Dekkera bruxellensis</i> (4,5) | <i>P. anomala</i>             |
| <i>C. norvegica</i>                                                                                   | <i>P. angusta</i>                 | <i>Williopsis californica</i> |
| <i>C. vartiovaarae</i>                                                                                | <i>P. fabianii</i>                | <i>Williopsis saturnus</i>    |
|                                                                                                       | <i>Wickerh. domercqiae</i>        |                               |

A 3. csoportot elválasztó tulajdonság, az eritrit asszimilációja, igen állandó bélyeg, az egyszerűsített identifikációs rendszerben szereplő fajok közül csak kettőnél változó (6. táblázat)

6. táblázat: Az eritritet asszimiláló élesztők

| 13 faj, 2 változó, ezek a zárójelben szereplő csoportokban is szerepelnek |                              |                                 |
|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| <i>C. cantarellii</i>                                                     | <i>Deb. hansenii</i> (4,5,6) | <i>P. burtonii</i>              |
| <i>C. diddensiae</i>                                                      | <i>Deb. polymorphismus</i>   | <i>P. farinosa</i>              |
| <i>C. mesenterica</i>                                                     | <i>Lipomyces lipofer</i>     | <i>S. copsis fibuligera</i> (4) |
| <i>C. tenuis</i>                                                          | <i>Lipomyces starkeyi</i>    | <i>Stephano. ciferrii</i>       |
|                                                                           |                              | <i>Yarrowia lipolytica</i>      |

Az alap határozókulcs az ureáz pozitív, a nitrátasszimiláló és az eritritasszimiláló csoportok elkülönítése után három újabb jellemzőt használ a további csoportok kialakítására. A cikloheximid (0,01 %) jelenlétében szaporodni képes élesztőket a cellobióz, a cikloheximidre érzékeny élesztőket a mannit asszimilációja szerint osztja 2-2 csoportra (7.-10. táblázat).

7. táblázat: A cikloheximid rezisztens, cellobiózt asszimiláló élesztők

| 19 faj, 7 változó, amelyek a zárójeles számú csoportokban is szerepelnek |                                   |                                |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| <i>Brett. naardenensis</i>                                               | <i>Dekkera anomala</i> (2,5)      | <i>Geo. fermentans</i>         |
| <i>C. maltosa</i>                                                        | <i>Dekkera bruxellensis</i> (2,5) | <i>Kluyv. lactis</i>           |
| <i>C. oleophila</i>                                                      | <i>Hsp. guilliermondii</i>        | <i>Kluyv. Marxianus</i> (5)    |
| <i>C. tropicalis</i> (5)                                                 | <i>Hsp. uvarum</i>                | <i>P. guilliermondii</i>       |
| <i>C. zeylanoides</i> (5)                                                | <i>Hsp. valbyensis</i>            | <i>S.copsis fibuligera</i> (3) |
| <i>Deb. Hansenii</i> (3,5,6)                                             |                                   | <i>Zygoascus hellenicus</i>    |
| <i>Deb. occidentalis</i>                                                 |                                   | <i>Zygo. fermentati</i>        |

8. táblázat: Cikloheximid tűrő, cellobiózt nem asszimiláló élesztők

| 22 faj, 10 változó (a zárójeles csoportokban is szerepelnek) |                                   |                          |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| <i>C. albicans</i>                                           | <i>Dekkera anomala</i> (2,4)      | <i>S. dairensis</i> (7)  |
| <i>C. catenulata</i>                                         | <i>Dekkera bruxellensis</i> (2,4) | <i>S. exiguus</i>        |
| <i>C. millerii</i> (7)                                       | <i>Dipodascus ingens</i>          | <i>S. unisporus</i>      |
| <i>C. parapsilopsis</i> (6)                                  | <i>Gal. geotrichum</i> (6)        | <i>S.copsis vini</i>     |
| <i>C. tropicalis</i> (4)                                     | <i>Geo. fragrans</i>              | <i>Tsp. globosa</i>      |
| <i>C. zeylanoides</i> (4)                                    | <i>Khuyv. marxianus</i> (4)       | <i>Zygo. cidri</i>       |
| <i>Deb. hansenii</i> (3,4,6)                                 | <i>Loddero. elongisporus</i>      | <i>Zygo. mrakii</i>      |
|                                                              |                                   | <i>Zygo. florentinus</i> |

9. táblázat: A cikloheximidre érzékeny, mannitot asszimiláló élesztők

| 23 faj, 10 változó (a zárójelben jelzett csoportba is tartozhatnak) |                              |                                   |
|---------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| <i>C. apicola</i>                                                   | <i>Deb. carsonii</i>         | <i>S. kluyveri</i> (7)            |
| <i>C. diversa</i>                                                   | <i>Deb. etchellsii</i>       | <i>Tsp. delbrueckii</i> (7)       |
| <i>C. intermedia</i>                                                | <i>Deb. hansenii</i> (3,4,5) | <i>Zygo. balii</i> (7)            |
| <i>C. parapsilopsis</i> (5)                                         | <i>Gal. geotrichum</i> (5)   | <i>Zygo. bisporus</i> (7)         |
| <i>C. rugosa</i>                                                    | <i>Khuyv. thermotolerans</i> | <i>Zygo. microellipsoides</i> (7) |
| <i>C. sake</i>                                                      | <i>Metsch. pulcherrima</i>   | <i>Zygo. mellis</i> (7)           |
| <i>C. vini</i>                                                      | <i>Metsch. reukaufii</i>     | <i>Zygo. rouxii</i> (7)           |
| <i>Clavispora lusitaniae</i>                                        | <i>P. ohmeri</i>             |                                   |

10. táblázat: A cikloheximidre érzékeny, mannitot nem asszimiláló élesztők

| 26 faj, 9 változó (zárójelben az egyéb csoport száma) |                           |                                   |
|-------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| <i>C. glabrata</i>                                    | <i>Issat. orientalis</i>  | <i>S. dairensis</i> (5)           |
| <i>C. inconspicua</i>                                 | <i>Issat. terricola</i>   | <i>S. kluyveri</i> (6)            |
| <i>C. milleri</i> (5)                                 | <i>P. nakasei</i>         | <i>S. pastorianus</i>             |
| <i>C. sorboxylosa</i>                                 | <i>P. fermentans</i>      | <i>Tsp. delbrueckii</i> (6)       |
| <i>C. stellata</i>                                    | <i>P. kluyveri</i>        | <i>Zygo. bailii</i> (6)           |
| <i>Hsp. occidentalis</i>                              | <i>P. membranifaciens</i> | <i>Zygo. bisporus</i> (6)         |
| <i>Hsp. osmophila</i>                                 | <i>S. codes ludwigii</i>  | <i>Zygo. microellipsoides</i> (6) |
| <i>Hsp. vineae</i>                                    | <i>S. bayanus</i>         | <i>Zygo. mellis</i> (6)           |
|                                                       | <i>S. cerevisiae</i>      | <i>Zygo. rouxii</i> (6)           |

## 2.4. Molekuláris módszereken alapuló identifikálás

A molekuláris biológiai technikák fejlődésével az élesztőgombák azonosítása lehetővé vált a ribonukleinsav és a dezoxiribonukleinsav vizsgálatával is. A nukleinsav-analízisen alapuló módszerek egyik előnye a fenotípusos bélyegek alapján történő identifikálással szemben, hogy a DNS nukleotid-szekvenciája gyakorlatilag független a tenyésztési körülményektől (Boer and Beumer, 1999). Segítségükkel a molekuláris szintű genetikai hasonlóságok és különbségek alapján mind a faji határok, mind az élesztők csoportjai közti rendszertani viszonyok, mind pedig az élesztők leszármazási kapcsolatai a gombák többi csoportjaival tisztázhatók (Deák, 1998).

### 2.4.1. DNS homológia eljárás

A legelső DNS technikák közé tartozik, amely a DNS-nek azon a tulajdonságán alapszik, hogy melegítéskor a két szála szétválik, hűtéskor újra összekapcsolódik. Két szervezetből származó egyszálú DNS molekulákat összekeverve, kétszálú hibridmolekulák kapcsolódnak össze, ha a kétféle DNS bázissorrendje legalább 80 %-ban megegyezik. A hibridizáció mértéke így alkalmas a két szervezet közti DNS szekvencia-homológia vizsgálatára. A kapott homológia értéke - mivel a hibridizáció feltétele a minimum 80%-os egyezés -, a fennmaradó 20% szekvencia-különbséget fejezi ki (Deák, 1998). A kapott szekvencia-homológia értékek alapján azonos fajba soroljuk a 80% feletti egyezést mutató szervezeteket (Deák és Beuchat, 1987; Kurtzman, 1984). Kurtzman (1984) néhány *Pichia* és *Hansenula* faj DNS homológia eljárással történő összehasonlításakor kapott nagyfokú (68-75 %-os) egyezés alapján vonta össze a két nemzetséget *Pichia* néven.

### 2.4.2. Restriktíós töredékosság

A restriktíós töredék hossz (RFLP) módszere a vizsgálandó DNS restriktíós enzimekkel való feldarabolásán és a kapott töredékek gélelektroforézissel történő szétválasztásán alapszik. Az így kapott mintázat a vizsgált genomra jellemző, egyedi lesz. A restriktíós enzimeket, amelyek a DNS-t a rá jellemző 4-6 bázishosszúságú szakasznál hasítják, baktériumokból állítják elő. A restriktíós fragmentumok közvetlen analízise azonban a kapott sávok nagy száma miatt korlátozott, a gélmintázat összemosódottá válhat. Ennek elkerülésére gyakran jelölt "próba" DNS hibridizáltatásával kiemelnek egy-egy DNS szakaszt a vizsgált DNS szakaszok közül. A próbák jelölése radioaktív izotóppal történik, amely

autoradiográfiával lefényképezhető. Ez a vizsgálat Southern blotting eljárás alkalmazásával valósítható meg, amely során a DNS fragmentumokat a törekeny agaróz gélről membránra viszik át. A radioaktív izotóppal jelölt DNS próbán kívül előnyösen alkalmazható módszer a hideg jelölés, amely kémiai kimutatható, dUTP-hez kötött biotin-sztreptavidin vagy dioxigenin, a kimutatáshoz pedig lúgos foszfatázhoz vagy más enzimhez kapcsolt immuno-kemilumineszcenciás reakció szolgál (Deák, 1998). Meaden (1990) összefoglaló áttekintést adott az RFLP módszerről és bemutatta a módszer használatát sörélesztő törzsek jellemzésére.

Az RFLP analízist Bostock és munkatársai (1993) a klinikai diagnosztikában *Candida albicans* élesztőtörzsek kimutatására és meghatározására alkalmazták.

Az RFLP módszer továbbfejlesztése a kisméretű és többszörös példányszámú mitokondrium DNS RFLP analízise. Az eljárás hátránya a mitokondrium DNS tisztításának nehézsége volt, azonban újabb, minipreparációs eljárások megjelenése (Querol és Ramon, 1996) amelyek jelentősen lecsökkentették a mtDNS tisztítási idejét, megnövelte az eljárás felhasználási gyakoriságát. Querol és munkatársai (1994) sikerrel alkalmazta a mtDNS RFLP eljárást bor erjedése során jelenlevő vad *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzsek tanulmányozásában. Martinez és munkatársai (1995) ugyancsak hasznosnak találták a módszert sherry bor készítésében fontos szerepet játszó hártaképző *Saccharomyces cerevisiae* élesztőtörzsek (*beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* és *rouxii*) elkülönítésében. Fernandez-Espinar és munkatársai (2001) hasonlóképpen alkalmasnak találta az mtDNS RFLP analízist 45 *Saccharomyces* borélesztő törzs összehasonlítására. Az RFLP módszer másik változata a riboszóma DNS vizsgálatán alapul. A riboszóma gének szintén sok ismétlésben találhatók meg, ezért RFLP mintázatuk még hibridizáció nélkül is értékelhető képet ad (Deák, 1998).

#### **2.4.3. Kariotipizálás**

A kariotipizálás a kromoszóma méretű DNS izolálásán és annak pulzáló mezejű gélelektroforézissel történő elválasztásán alapuló módszer. Ez az eljárás az egyszerű gélelektroforézissel szemben nagyobb méretű DNS molekulák, teljes kromoszómák elválasztására alkalmas, mert az elektromos erőter irányának periodikus változását a nagyobb molekulák lassabban képesek követni, mint a kisebbek, ezért a méretüknek megfelelően szétválnak egymástól (Deák, 1995). Az elektroforézises kariotipizálás során a fajra jellemző kromoszómák nagysága és száma (a kariotípus) határozható meg a kapott gélmintázat alapján. Az élesztők kariotípusa nagy változatosságot mutathat egy faj törzsei között is az adott faj

polimorfizmusának köszönhetően, amely alapján ez a módszer jól használható a törzsek jellemzésére is.

A pulzáló erőterű gélelektroforézist (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) először Schwartz és Cantor (1984) fejlesztették ki élesztőgombák kromoszóma-összetételének vizsgálatához. A módszer a DNS molekulák méret szerinti szétválasztására alkalmasnak bizonyult, a gélben azonban torzult sávok keletkeztek, ami gátolta a vizsgált minták összehasonlítását. Az eljárás másik változata, az ortogonális mezejű gélelektroforézis (orthogonal field alternation gel electrophoresis, OFAGE) (Carle és Olson, 1985) létrehozásakor már csak a külső sávoknál tapasztaltak elhajlást. A kariotipizálásnál használt műszer fejlesztésének a célja is arra irányult, hogy minél egységesebb elektromos erőteret hozzanak létre a cella belsejében, amely értékelhető gélmintázatot eredményez a vizsgálatok során. Az eljárás ilyen változata a rögzített homogén elektromos mezejű elektroforézis (contour-clamped homogeneous electric field, CHEF), a keresztirányban változó mezejű elektroforézis (transverse alternating field electrophoresis, TAFE) és a rotáló gélelektroforézis (rotating field electrophoresis, RFE).

A különböző élesztők kariotípusa nagy változatosságot mutat, egy faj különböző törzsei között is. Számos élesztő kariotípusa vált már ismertté, különösen a *Saccharomyces* nemzetség volt már számos vizsgálat tárgya. Vezinhet és munkatársai (1990) 22 borélesztő *Saccharomyces cerevisiae* törzset 20 kariotípusba tudtak sorolni keresztirányban változó mezejű elektroforézis (TAFE) segítségével. Vaughan-Martini és munkatársai (1993) a *Saccharomyces sensu stricto* fajok (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus* és *Saccharomyces pastorianus*) rögzített homogén elektromos mezejű elektroforézis segítségével történő kariotipizálásakor 12-17, kis, közepes és nagy mérettartományba (300-2200 Kbp) eső kromoszómákat választottak szét, a *Saccharomyces sensu lato* fajok (*Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces dairensis*, *Saccharomyces castelli*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces servazzii* és *Saccharomyces kluyverii*) esetén 11 vagy annál kevesebb, nagy és közepes, illetve a *Saccharomyces kluyverii*-nél csak nagyméretű kromoszómákat tudtak kimutatni. Az egyes fajokhoz tartozó törzsek gélmintázatát összehasonlítva a *Saccharomyces dairensis*, a *Saccharomyces exiguus*, a *Saccharomyces servazzii* és a *Saccharomyces unisporus* esetében a DNS sávok számában és méretében megnyilvánuló polimorfizmus mutatkozott. Tornai-Lehoczki és Dlačhy (1996) a sörgyártásban és a borkészítésben fontos szerepet játszó *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* és *Saccharomyces bayanus* élesztőfajok törzseinek összehasonlításához alkalmazták sikerrel a rotáló gélelektroforézist (RFE). További vizsgálataik során (Tornai-Lehoczki és Dlačhy, 2000) ezt a módszert nemcsak a

sörgyártásban alkalmazott *Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces pastorianus* típustörzsek és szinoním típustörzsek megkülönböztetésére találták alkalmasnak, hanem az egymáshoz közel álló "ale" és "lager" sörélesztő törzsek elválasztására is.

Ellentétben a *Saccharomyces cerevisiae* 16 kromoszómájával, amelyek közül 11 kisebb, mint 1000 Kbp nagyságú, számos, nem a *Saccharomyces* nemzetségbe tartozó élesztőfaj kevesebb számú, 1000 Kbp-nál nagyobb kromoszómával rendelkezik. Ezeknek az élesztőfajoknak a nagyobb kromoszómáit, amelyek mérete csak kicsit tér el egymástól, nehéz pulzáló gélelektroforézissel szétválasztani, mivel a méret növekedésével a kromoszómák elektroforézises mozgékonyága csökken (Versavaud és Hallet, 1995). Ezeknél az élesztőfajoknál a kariotipizálás csak a kromoszómák számát és nagyságát figyelembe vevő módosításokkal alkalmazható. Johnston és munkatársai (1988) a futtatás körülményeit megfelelőképpen megváltoztatva sikerrel alkalmazták a pulzáló gélelektroforézist az 1000 Kbp-nál nagyobb méretű kromoszómákat tartalmazó *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia canadensis* és *Schwanniomyces* (ma: *Debaryomyces*) *occidentalis* élesztőfajok kariotipizálásához. A módszer megfelelően bizonyult a két utóbbi élesztőfaj különböző törzsei közt mutatkozó polimorfizmus kimutatására is. Sor és Fukuhara (1989) már nagyon széles mérettartományba eső (250-4000) kromoszómákat is szét tudtak választani, amikor a *Kluyveromyces* nemzetségbe tartozó élesztőfajokat hasonlítottak össze egymással. A módszerrel a *Kluyveromyces marxianus* változatait is meg tudták egymástól különböztetni a kariotípusuk változatossága alapján. Asakura és munkatársai (1991) az egyes élesztőfajok törzsei között fellépő polimorfizmust a klinikai mintákból származó *Candida glabrata* és *Candida albicans* törzsek eredetének kiderítésében, epidemiológiai vizsgálatokban találták hasznosnak.

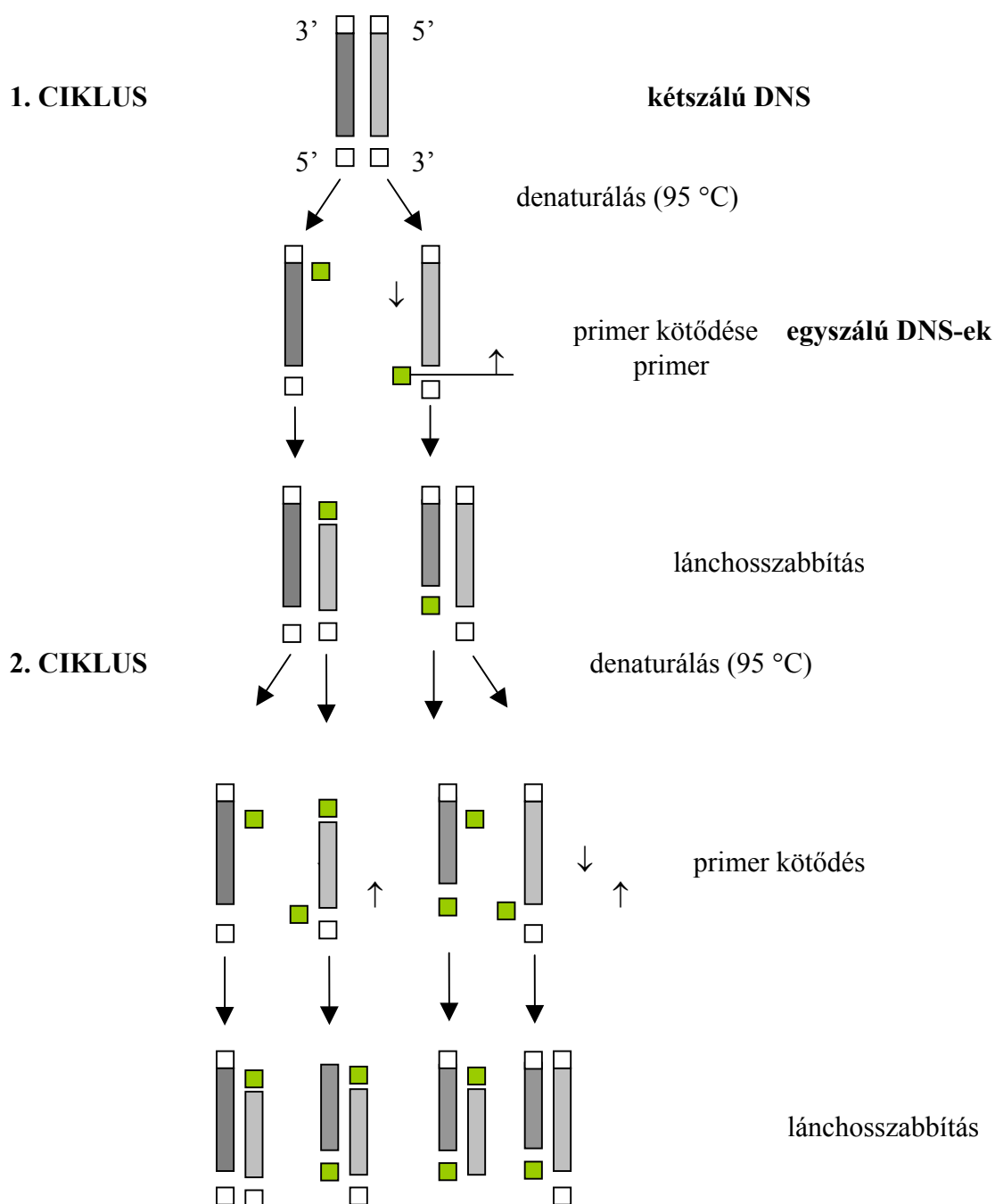
A pulzáló gélelektroforézist megelőzően a kromoszómák kevés helyen hasító restrikciós endonukleázzal történő emésztése másik lehetőség ezeknek a nagyméretű kromoszómákkal rendelkező élesztőfajok törzseinek összehasonlító vizsgálatában. Versavaud és Hallet (1995) a *Not I*, *Sfi I* és *Sma I* restrikciós endonukleázokat sikeresen alkalmazta a *Candida famata*, a *Kloeckera apiculata* és *Schizosaccharomyces pombe* élesztőfajok törzseinek keresztirányban változó mezejű elektroforézis (TAFE) segítségével történő összehasonlításához.

### 2.4.3. Polimeráz láncreakció (PCR)

A polimeráz láncreakció a specifikus nukleinsav szekvenciák *in vitro* amplifikálására alkalmas eljárás. Segítségével a kis mennyiségben jelenlevő DNS is gyorsan és hatékonyan megsokszorozható. A polimeráz láncreakció jelentőségét mutatja, hogy kidolgozóját, Kary B. Mullist 1993-ban kémiai Nobel díjjal jutalmazták (Kracher, 1995). A PCR-t napjainkban már rutinszerűen alkalmazzák, alapjává vált számos újabb molekuláris biológia módszernek.

A megsokszorozítandó target DNS amplifikálása 20-35-ször ismétlődő, három lépésből (denaturálás, hibridizáció, lánchosszabbítás) álló ciklus alatt következik be (1.ábra). A denaturálás során a nagy hőmérsékletnek (95°C) köszönhetően a target DNS két szála elválik egymástól. Az ezt követő hibridizáció az oligonukleotid primerek 40-60 °C-on történő bekapcsolódását jelenti az egyszálú DNS szálakhoz. A ciklus utolsó lépése a DNS lánccok meghosszabbítása a DNS polimeráz segítségével a dNTP molekulák felhasználásával. Ez megközelítőleg 74 °C-on, az enzim optimális működési hőmérsékletén történik. A PCR utolsó fázisa a ciklusok lezajlását követően a végső lánchosszabbítás amely során az összes DNS másolása befejeződik. Egy-egy ciklus során a DNS mennyisége elméletileg megkettőződik, így a 20-35 ciklus során a képződött DNS mennyiség már jól detektálható az etidium bromidos festést követően UV fényben.

A reakció specifikussága elsősorban a DNS nagymértékben konzervált vagy változó szekvenciájú részeire tervezett rövid DNS fragmentumok, a primerek bázissorendjén alapszik. Az egyszálú DNS szál komplementerének szintetizálásáért a DNS polimeráz a felelős, ami a reakcióelegyhez adagolt dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dNTP) molekulákat felhasználva 5'-3' irányba végzi a lánchosszabbítást. Legismertebb polimeráz a *Thermus aquaticus* eubaktériumokból izolált hőstabil Taq polimeráz. Ezenkívül számos más polimeráz is alkalmazható a PCR munkák során. Az enzim működéséhez optimális körülmények magnézium-klorid és puffer adagolásával érhetők el.



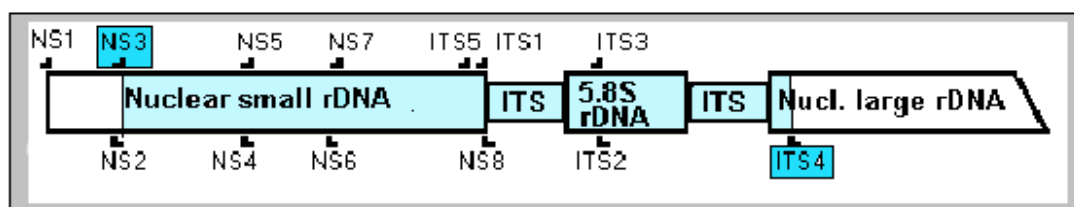
1. ábra. A PCR menetének vázlatja

A PCR módszerrel nem különösebben tiszta DNS kivonatból indulva is, specifikus primerekkel olyan szekvenciákat kaphatunk, melynek gélmintázata diagnosztikus különbségeket mutat élesztőfajok és törzsek között, restrikciós hasítás és DNS próbák nélkül is (Deák, 1998). Pearson és McKee (1992) *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* és *Zygosaccharomyces rouxii* élesztőfaj plazmidot tartalmazó törzseit hasonlította össze a plazmid meghatározott részeire tervezett primerek segítségével. Az eljárást alkalmasnak találták e három élesztőfaj azonosítására, az egyedüli hátrányt az jelenti, hogy a plazmid

néhány törzs esetében hiányozhat. Lavallée és munkatársai (1994) Ty transzpozon delta-elemeket ( $\delta 1$  és  $\delta 2$ ) alkalmazta eredményesen a PCR módszerhez primerként a borászati üzemi erjesztéshez használt *Saccharomyces cerevisiae* törzseinek évről-évre történő megfigyeléséhez.

#### 2.4.4. PCR-ribotipizálás

Ha a már említett RFLP analízist PCR segítségével amplifikált riboszóma DNS (rDNS) géneken végezzük, a módszert ribotipizálásnak nevezzük. A riboszóma nukleinsavakat kódoló szekvenciákból többféle primert lehet készíteni, a vizsgálatnak megfelelően. Az 2. ábrán a nukleáris rDNS és a primerek kötődési helyei láthatóak (Innis and Gelfand, 1990).



2. ábra. A nukleáris rDNS és az NS és ITS primerek kötődési helyei

Az rDNS gének különböző szakaszaiból kiválasztott primerek PCR termékeiből restrikciós hasítással változó hosszúságú töredékek nyerhetők.

Dlauchy és munkatársai (1999) eredményesen alkalmazták a ribotipizálást 128 különféle fajba tartozó, főképp élelmiszerből, sörből, borból és üdítőitalokból származó élesztő azonosításához. A vizsgálat során NS1 és ITS2 primerek segítségével a 18S rDNS és a vele szomszédos ITS1 szakaszt szaporították, majd négy különböző enzimmel végezték el az amplikonok hasítását. A módszert a vizsgált élesztőfajok azonosítására alkalmasnak találták. Deák és munkatársai (2000) 5,8S rDNS szakaszt szaporították ITS1 és ITS4 primerek felhasználásával baromfiból származó *Candida zeylanoides* és *Yarrowia lipolytica* törzsek összehasonlításához. Az amplikonok *Hinf I* illetve *Hae III* enzimmel történő hasítása és a töredékek gélelektroforézises futtatása után azonos gélmintázatot kaptak az azonos fajba tartozó törzseknél. Caruso és munkatársai (2002) szerint is hasznosnak bizonyult a PCR-ribotipizálás *Saccharomyces cerevisiae* és *Kloeckera apiculata* élesztőfajba tartozó izolátumok a bor erjedése során történő nyomonkövetéséhez. Az NS régió sokszorozását követő *Hae III* és *Msp I* restrikciós enzimes emésztése után azonos gélmintázathoz jutottak az

egyres fajba tartozó izolátumok esetén, csupán egy *Saccharomyces cerevisiae* izolátum mutatott kisebb polimorfizmust.

#### **2.4.5. Random amplifikált polimorfikus DNS (RAPD) és a microsatellite-PCR módszerek**

Williams és munkatársai (1990) a PCR módszert fejlesztette tovább és egyszerűsítette azzal, hogy tetszőleges DNS szakaszokat amplifikált találomra alkalmazott primerek felhasználásával, specifikus mintázatokat adó reakciótermékekhez jutva ezzel. Az eljárás random amplifikált polimorfikus DNS (RAPD) módszer néven vált ismerté. A többi PCR-alapú módszertől két jelentős eltérés különbözteti meg: az alkalmazott primerek jóval rövidebbek, általában 10 bázispár hosszúságúak, valamint a hibridizációnál alkalmazott hőmérséklet is alacsonyabb, megkönnyítve ezzel a primerek target DNS-hez való kapcsolódását. A kissé hosszabb primereket alkalmazó Microsatellite-PCR (RAM-PCR) a RAPD-PCR technika egy változatának tekinthető, mert a RAPD-hoz hasonlóan alacsony hibridizációs hőmérsékletet alkalmaz, amely következtében itt is tetszőlegesen kötődnek a primerek a megfelelő DNS szakaszokhoz. A RAPD módszer gyorsan széles körben elterjedt, hiszen alkalmazásához nem szükséges restrikciós hasítás, DNS próba, sőt a primer szekvencia előzetes ismerete sem (Deák, 1998).

Az eljárás sikeres alkalmazására számos példa van. Baleiras Couto és munkatársai (1994) élelmiszerekben és italokban romlást okozó *Zygosaccharomyces* élesztőtörzseket különböztettek meg egymástól faji szinten. Prillinger és munkatársai (1999) különféle sajtokból származó élesztőizolátumokat azonosítottak a RAPD módszerrel. Ehhez hasonlóan Andrighetto és munkatársai (2000) is eredményesen tudták használni ezt a technikát különböző típusú tejtermékekből gyűjtött élesztők faji szinten történő azonosításához. Tornai-Lehoczki és Dlačhy (2000) a kariotipizáláshoz hasonlóan a RAPD analízist is alkalmasnak találták a sörgyártásban és a borkészítésben szerepet játszó *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus* és *Saccharomyces bayanus* élesztőfajok törzseinek összehasonlításához. Gente és munkatársai (2000) *Geotrichum candidum* élesztőizolátumok törzsi szinten történő összehasonlításához használták a RAPD módszert a hosszabb primereket alkalmazó RAM-PCR-rel kombinálva, amely eredményeként nagymértékű fajon belüli polimorfizmust tudtak megfigyelni. Deák és munkatársai (2000) baromfihúsból gyűjtött élesztőizolátumok közül a két leggyakrabban előforduló faj, a *Yarrowia lipolytica* és a *Candida zeylanoides* törzsi szinten történő összehasonlításához használta a RAPD analízist, amely során - öt kereskedelmi forgalomban kapható, 10 bázispárból álló primert is

sikertelenül kipróbálva-, a jóval hosszabb ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) primerek segítségével jutottak a törzsek között különbséget mutató eredményekhez.

#### 2.4.6. Nukleinsav szekvenálás

A mikrobiológiában a riboszóma DNS-ének szekvenálására az enzimes szintézis módszerét alkalmazzák, amely során négy reakcióelegyet állítanak össze. Az egyes reakciókhoz a négyféle nukleotidon és a DNS polimerázon kívül didezoxi-nukleotidot is adnak. Ha ez a szintézis során valahová bekapcsolódik, leállítja a reakciót, ezáltal különböző nagyságú darabokat kapunk. Ezeket a darabok a gélben különböző sávokat adnak, amelyeket a nukleotidokhoz kapcsolt radioaktív jelölés segítségével azonosítanak és a bázisok sorrendjét összeolvassák (Deák, 1998).

A eukarióta sejtek riboszómáiban a sejtekben a kis alegységben 18S, a nagy alegységben 25S, 5S és 5,8 S nagyságú, a prokarióta sejtekben pedig 16S, 23S és 5S rRNS van. Ezeknek az rRNS-eknek különleges taxonómiai jelentőségük van, mivel konzervatív szekvenciáik elemzéséből nagy evolúciós távolságokra lehet következtetni. PCR módszerrel, megfelelő primereket választva, a molekulák részleges szekvenálása sokkal gyorsabb, mint a teljes molekuláé. A szekvenálási módszerek fejlődésével a nemzetközi adatbázisokban (EMBL, Genbank, DDBJ és mások) egyre több szekvencia gyűlik össze, elsősorban a 18S rRNS-ről. Az RNS bázissorrend elemzését a reverz transzkriptáz reakció alkalmazása nagyon megkönnyítette, amely során a ribonukleinsavról DNS másolat (cDNS) készíthető (Deák, 1998).

Kurtzman és Blanz (1998) összefoglaló áttekintést adott az rDNS és az rRNS nukleotid szekvencián alapuló filogenetikai analízisről, amelyet különböző élesztőfajok rokonsági viszonyainak vizsgálatához használtak. Fell és munkatársai (2000) 337 bazidiumos gomba törzset osztályozott 230 fajba a nagy rDNS-ük D1/D2 régiójának szekvenciája alapján. Cappa és Cocconcelli (2001) tejtermékekből származó élesztő- és penészgombák meghatározásához használták ezt a módszert. A 18S RNS egy 581 bázispár hosszúságú szakaszát sokszorozták meg T1 és T2 primerek segítségével, majd egy 400 bázispáros szakaszt szekvenálva az izolált *Zygosaccharomyces microellipsoides* fajhoz tartozó élesztőket és a *Penicillium chrysogenum*, valamint a *Cladosporium cladosporoides* penészeket sikeresen határozták meg.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. ANYAGOK

##### 3.1.1. TEJIPARI MINTÁK

*11. táblázat: A különféle tejtermékekből gyűjtött izolátumok száma*

| <b>Izolátumok származási helye</b> | <b>Izolátumok száma</b> |
|------------------------------------|-------------------------|
| Bakony camembert sajt              | 10                      |
| Bakony tehéntúró                   | 2                       |
| Ementáli sajt                      | 1                       |
| Kecskesajt                         | 2                       |
| Márványsajt                        | 9                       |
| Mizzo tehéntúró                    | 2                       |
| Nagybánhegyesi tehéntúró           | 6                       |
| Nádudvari tehéntúró                | 10                      |
| Pálpusztai sajt                    | 2                       |
| Sole tehéntúró                     | 2                       |
| Tihany camembert sajt              | 2                       |
| Tolle tehéntúró                    | 5                       |
| Trappista sajt                     | 8                       |
| Túró Rudi                          | 3                       |
| Veszprémtej tehéntúró              | 2                       |

### 3.1.2. REFERENCIA ÉLESZTŐTÖRZSEK

12. táblázat: A vizsgálatokhoz használt referencia élesztőtörzsek

| Élesztőfajok                    | Törzs                    |
|---------------------------------|--------------------------|
| <i>Candida catenulata</i>       | NCAIM <sup>1</sup> Y1032 |
| <i>Candida glabrata</i>         | CBS <sup>2</sup> 138     |
| <i>Candida lusitanae</i>        | CBS 6936                 |
| <i>Candida maltosa</i>          | CBS 5611                 |
| <i>Candida mesenterica</i>      | NCAIM Y1072              |
| <i>Candida parapsilopsis</i>    | CBS 604                  |
| <i>Candida rugosa</i>           | CBS 613                  |
| <i>Candida sake</i>             | CBS 159                  |
| <i>Cryptococcus curvatus</i>    | NCAIM Y1210              |
| <i>Cryptococcus laurentii</i>   | NCAIM Y1321              |
| <i>Debaryomyces hansenii</i>    | NCAIM Y 898              |
| <i>Dekkera bruxellensis</i>     | NCAIM Y1007              |
| <i>Geotrichum candidum</i>      | NCAIM Y274               |
| <i>Kluyveromyces lactis</i>     | NCAIM Y0260              |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i>  | NCAIM Y1070              |
| <i>Metschnikowia reukaufii</i>  | NCAIM Y 1120             |
| <i>Pichia carsonii</i>          | NCAIM Y968               |
| <i>Pichia fermentans</i>        | NCAIM Y86 <sup>T</sup>   |
| <i>Pichia kluyverii</i>         | NCAIM Y680               |
| <i>Pichia membranifaciens</i>   | NCAIM Y1044 <sup>T</sup> |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | NCAIM Y212               |
| <i>Saccharomyces exiguus</i>    | NCAIM Y1033 <sup>T</sup> |
| <i>Torulaspora delbrueckii</i>  | NCAIM Y982               |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>      | NCAIM Y591, CBS 6124     |

<sup>1</sup>National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NCAIM), Hungary

<sup>2</sup>Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), The Netherlands

<sup>T</sup>Típustörzsek

### 3.1.3. CSIRKEHÚSBÓL SZÁRMAZÓ IZOLÁTUMOK

A tejtermékekből gyűjtött izolátumokkal összehasonlított, csirkehúsból származó élesztőtörzseket Ismail és társai (2000) izolálták.

12. táblázat. Csirkehúsból származó izolátumok

| Izolátum jele | Izolálás forrása        |
|---------------|-------------------------|
| Y 01481       | csirkemáj, Griffin, GA  |
| Y 01482       | csirkemáj, Griffin, GA  |
| Y 01483       | csirkemáj, Griffin, GA  |
| Y 01484       | csirkemáj, Griffin, GA  |
| Y 01485       | csirkemáj, Griffin, GA  |
| Y 01486       | csirkemell, Griffin, GA |
| Y 01487       | csirkemáj, Griffin, GA  |
| Y 01488       | csirkemell, Griffin, GA |
| Y 01489       | csirkemell, Griffin, GA |

### 3.1.4. A VIZSGÁLATOKHOZ HASZNÁLT TÁPOLDATOK ÉS TÁPTALAJOK

#### Az összehasonlított táptalajok

#### **Bengál rózsza kloramfenikol agar (RBC, 1 L; pH=7,2)**

RBC portáptalaj (MERCK) 32,2 g

#### **Bifenillel kiegészített maláta kivonat agar (MEP, 1 L; pH=5,4)**

Malt extract agar (MERCK) 48 gr

Bifenil 0,5 gr

Oxitetraciklin 100 mg

#### **Diklorán bengál rózsza kloramfenikol agar (DRBC, 1 L; pH=5,6)**

DRBC portáptalaj (MERCK) 31,6 g

**Diklorán 18 %-os glicerol agar (DG18, 1 L; pH=5,6)**

DG 18% alapagar-por (MERCK) 31,6 g

Glicerín 220 ml

Kloramfenikol 100 mg

**Élesztőkivonat agar eugenollal kiegészítve (YEE, 1 L; pH=7,2 )**

Yeast extract agar (MERCK) 35 g

Eugenol 200 mg

**Élesztőkivonat glükóz kloramfenikol agar oligomicinnel kiegészítve (YGCO, 1L; pH=6,6)**

Yeast extract glucose chloramphenicol agar (MERCK) 40 g

Oligomycin (100  $\mu\text{l ml}^{-1}$  oldatból a táptalaj felületén elosztatva) 0,1 ml

**Maláta kivonat agar marha epével kiegészítve (MEO, 1 L; pH=5,4)**

Malt extract agar (MERCK) 48 g

Marha epe 2 g

**Molibdát agar (M, 1 L; pH=5,3)**

Alapoldat:

Szaharóz 40 g

Agar 15 g

Foszfomolibdénsav oldat:

$\text{P}_2\text{O}_5\cdot\text{MoO}_3$  12,5 g 100  $\text{ml}^{-1}$

Molibdát agar összeállítása:

Alap 100 ml

Foszfomolibdénsav oldat 1,5 ml

**Molibdénsav agar kalcium propionáttal kiegészítve (MEC, 1 L; pH=7,6)**

Molibdénsav agar

Kalcium propionát (10%-os oldatból) 1,25 ml

**Nátrium-kloriddal kiegészített maláta kivonat agar (MES, 1 L; pH=6,0)**

Malt extract agar (MERCK) 48 g

Nátrium-klorid 40 g

Oxitetraciklin 100 mg

**Oxitetraciklin gentamicin glükóz élesztőkivonat agar (OGGY 1 L; pH=7,0):**

Oxitetracycline glucose yeast agar (30g L<sup>-1</sup> oldatból)(MERCK) 800 ml

Oxitetraciklin (0.1 %-os oldatból) 100 ml

Gentamicin (0.05%-os oldatból) 100 ml

**Az izolátumok fenntartására használt ferdeagar**

**Trypton-glükóz-élesztőkivonat (TGY) agar (1 L; pH=7,0)**

Trypton 5 g

Glükóz 1g

Élesztőkivonat 2,5 g

Agar 15 g

**Az egyszerűsített identifikációs módszerhez használt táplevesek és tápközegek**

**Burgonya-glükóz agar (PDA, 1 L)**

Burgonya glükóz agar (Becton Dickinson) 39 g

**C-alap (nitrogénforrás asszimilációhoz, 1 L)**

Bacto carbon base (Difco) 1,17 g

Agar 15 g

**Cikloheximides leves (0.01%, 1 L)**

Trypton 5 g

Élesztőkivonat 5 g

Glükóz 10 g

Cikloheximid (1%-os oldatból) 10 ml

**Cukorerjesztő leves (1 L)**

Tripton 5 g

Élesztőkivonat 5 g

Glükóz 20 g

Brómtimolkék (1% etanolos oldatból) 2,5 ml

Durham-cső

**Gyors urea leves (1 L)**

Élesztőkivonat 0,1 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 91 mg

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 95 mg

Karbamid (urea) 20 g

Fenolvörös (1 %-os oldatból) 1 ml

**N-alap (szénforrás asszimilációhoz, 1 L):**

Bacto Nitrogen Base (Difco) 0,67 g

Agar 15 g

**Candida galli jellemzésére használt tápagarok és táplevesek****Arbutin bontás vizsgálatához használt táptalaj (100 ml)**

Arbutin 0,5 g

Élesztőkivonat 1 g

Agar 2 g

Vas-ammónium-citrát (1 %-os oldat) 2 ml

**C-alap (nitrogénforrás asszimilációhoz, 1 L)**

Bacto Carbon Base (Difco) 1,17 g

Agar 20 g

**Cikloheximid rezisztencia vizsgálatához használt leves (1 L)**

Bacto Yeast Nitrogen Base (Difco) 6,7 g

Glükóz 5 g

Cikloheximid 0,1 w/v végkoncentrációig

**Custer-féle kalcium-karbonátos táptalaj (glükózból való savképzés vizsgálatára, 1L)**

Glükóz 50 g

Kalcium karbonát 5 g

Élesztőkivonat 5 g

Agar 20 g

**Diazonium Blue B reagens (15 ml)**

Diazonium Blue B só 15 mg

Tris-(hidroximetil)-aminometán puffer (0,25 M, pH = 7) 15 ml

**Ecetsavas (1%) táptalaj (ecetsav túrés vizsgálatához, 100 ml)**

Glükóz 10 g

Trypton 1 g

Élesztőkivonat 1 g

Agar 2 g

**Élesztőkivonat-maláta-kivonat (YM, 1 L) agar**

Élesztőkivonat 3 g

Maláta-kivonat 3 g

Pepton 5 g

Glükóz 1 g

Agar 20 g

**Gorodkova agar (zsírbontás vizsgálatához)**

glükóz 1 g

nátrium-klorid 5 g

pepton 10 g

agar 20 g

**Glükóz-nitrogén alap (30 °C-on és 37 °C-on való növekedés vizsgálatához, 1 L)**

Bacto Yeast Nitrogen Base (Difco) 6,7 g

Glükóz 5 g

**Keményítő képzésének vizsgálatára használt tápagar (1 L)**

Glükóz 10 g

Bacto Yeast Nitrogen Base (Difco) 6,7g

Agar 15 g

**Lugol oldat (keményítő képzésének vizsgálatához, 300 ml)**

Jód 1 g

Kálium jodát 2 g

**N-alap (szénforrás asszimilációhoz, 1 L)**

Bacto Nitrogen Base (Difco) 0,67 g

0,5 g glükózzal egyenértékű szénforrás

**Urea bontás vizsgálatához használt leves (3 ml)**

Bacto Urea Broth (Difco) 1 fiola

**Vitaminmentes tápleves (1 L)**

Bacto Vitamin-free Yeast Base (Difco) 1,67g

**Zselatin folyósítás vizsgálatához használt táptalaj (1 L)**

Zselatin 100 g

Glükóz 5 g

Bacto Yeast Nitrogen Base (Difco) 6,7g

**3.1.5. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MUNKÁHOZ FELHASZNÁLT ANYAGOK**

**A kariotipizáláshoz felhasznált oldatok:**

**blokkmosó puffer (1 L):**

EDTA (pH=9) 18,61 g

**blokktaroló puffer (1 L):**

EDTA (pH=9) 186,12 g

**CPE oldat (1 L):**

Citromsav 84,05 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 21,35g

Ezeket feloldjuk, beállítjuk pH 6-ra, sterilezzük, majd hozzáadunk:

20 mM EDTA-t (0.5 M-os törzsoldatból, pH 7.5) 7,44 g

**CPES oldat (1 L):**

Citromsav 84,05 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 21,35 g

Szorbitol 218,60

Ezeket feloldjuk, beállítjuk pH 6-ra, sterilezzük, majd hozzáadunk:

EDTA-t (0.5 M-os törzsoldatból, pH 7.5) 7,44 g

ditiotreitolt (1 M-os törzsoldatból, felhasználás előtt) 0,77 g

**S3-oldat (1 L):**

EDTA (pH 9) 167,50 g

TrisHCl (pH 8) 1,57 g

Szarkozil (Na-lauril-szarkozilát) 1 %

Proteináz-K (felhasználás előtt frissen elkészítve) 1 g

**10 X TBE puffer (1 L):**

Tris base 108,00 g

Bórsav 55,00 g

EDTA (0,5 M-os, pH=8.5 törzsoldatból) 7,44 g

**A polimeráz láncreakcióhoz (PCR) felhasznált oldatok****B oldat (1 L):**

NaCl 5,84 g

TrisHCl (pH=8) 1,57 g

EDTA 3.72 g

Triton X-100 (frissen hozzáadva a felhasználás előtt) 2 % v/v

SDS (frissen a felhasználás előtt) 1 % w/v

**Etídium-bromid törzsoldat (1 ml):**

Etídium-bromid 10.0 mg

**PCI oldat:**

Pufferolt fenol / kloroform / izoamilalkohol 25/24/1 v/v/v

**TE puffer (1 L):**

TrisHCl (pH=8) 1,576 g

EDTA 0,372 g

**3.1.6. RESTRIKCIÓS ENZIMEK, PRIMEREK, POLIMERÁZ, ESZKÖZÖK, MŰSZEREK**

**DyNAzyme™ II DNS polimeráz (2 U  $\mu\text{l}^{-1}$ )(Finnzymes)**

**10x puffer a Dynazyme polimeráz használatához (Finnzymes)**

**Oligonukleotidok (Finnzymes)**

dNTP mix: egyenlő arányban (10 mM) tartalmazza a négy oligonukleotidot, a dATP-t, a dCTP-t, a dGTP-t és a dTTP-t

**Primerek**

*14. táblázat:* Molekuláris módszerekhez használt primerek (Bio-Science)

| Primer               | Szekvencia               | Alkalmazás |
|----------------------|--------------------------|------------|
| NS1                  | 5'GTAGTCATATGCTTGTCTC3'  | ITS-PCR    |
| ITS2                 | 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3' | ITS-PCR    |
| ITS3                 | 5'GCATCGATGAAGAACGCAGC3' | ITS-PCR    |
| LR5                  | 5'ATCCTGAGGGAAACTTC3'    | ITS-PCR    |
| OPE 16               | 5'GGTGACTGTG3'           | RAPD-PCR   |
| M13 (microsatellite) | 5'GAGGGTGGXGGXTCT3'      | RAPD-PCR   |

## A kísérlethez használt restrikciós enzimek (Promega) és azok hasítási helyei

|                |                                                  |
|----------------|--------------------------------------------------|
| <i>Alu I</i>   | AG ▼ CT                                          |
| <i>Hae III</i> | GG ▼ CC                                          |
| <i>Msp I</i>   | C ▼ CGG                                          |
| <i>Not I</i>   | GC ▼ GGCCGC                                      |
| <i>Sfi I</i>   | GGCCNNNN ▼ NGGCC (N = A, vagy C, vagy G, vagy T) |

### Eszközök, műszerek

PCR készülék (Hybaid Thermocycler )

horizontális elektroforézis készülék (Hybaid)

## 3.2. MÓDSZEREK

### 3.2.1. Sajtminták elkészítése

A roquefort sajtot (Mizzo cég által gyártott magyar termék) szupermarketből szereztem be és a vizsgálatát azonnal elkezdtem. A sajtot három almintára vágtam szét, és minden darabból tíz grammot 90 cm<sup>3</sup> 0,1%-os peptonvízben homogéneztem Stomacher készülék (Bagmixer<sup>R</sup> 400, Interscience) segítségével. Ezután két párhuzamosban tízes alapú hígítási sort készítettem a hatodik hígítási tagig.

### 3.2.2. Telepszámlálás

Minden táptalajból tizennyolc lemezt készítettem (három almintából két párhuzamost) a három legnagyobb hígítási fokokból (10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>) úgy, hogy 0,1 cm<sup>3</sup> mennyiséget szélesztettem a telepek felszínén. A lemezeket 25 °C-on öt napig tartó inkubálás után értékelttem. A telepeket morfológiájuk alapján különböztettem meg és a baktériumokat, penészeket, valamint az élesztőket külön számláltam meg. A kapott adatok 6. táblázatban láthatóak.

### **3.2.3. Táptalajok összehasonlítása**

A táptalajok összehasonlításakor kapott eredmények feldolgozása az adatok tízes alapú logaritmusának kiszámolása után Statgraphics statisztikai program (Version 5.1; Statistical Graphics Corporation) segítségével, kéttényezős varianciaanalízis alapján készült ( $P < 0.05$ ).

### **3.2.4. Élesztőtörzsek izolálása**

Az élesztőtörzsek szelektív izolálását diklorán bengál rózsa (DRBC) táptalajon végeztem el. Először a kereskedelmi forgalomban vásárolt, különféle gyártótól származó és különféle típusú tejterméket Stomacher (Bagmixer<sup>R</sup> 400, Interscience) készülékkel homogenáltam steril desztillált vízben 1: 9 arányban. A szuszpenzióból 10-es alapú hígítási sort készítettem, majd a hígítási sor tagjaiból a DRBC táptalajra oltottam le. Az izolátumokat 7 napos 25 °C-on való inkubálás után gyűjtöttem.

### **3.2.5. Élesztőtörzsek fenntartása**

Az élesztőtörzsek fenntartása tripton-glükóz-élesztőkivonat (TGY) agaron 4 °C-on történt.

### **3.2.6. A tejtermékekből származó élesztőtörzsek egyszerűsített identifikációs módszerrel történő identifikálása**

A tejtermékekből származó élesztőtörzsek hagyományos módszereken alapuló identifikálását a 2.3.1. pontban leírt, Deák és Beuchat (1993) által kifejlesztett egyszerűsített identifikációs eljárás alapján (Simplified Identification Method, SIM) végeztem. A hifa- és álhifa vizsgálatokhoz burgonya-glükóz agart használtam, amelyből steril tárgylemezre vékony réteget pipettáztam. A tárgylemez steril Petri csészében, U alakú üvegboton állt, mellé nedves vattát helyeztem. Ezt, valamint az urealevest közvetlenül a tenyészetből oltottam be. Az urea próbát 37 °C-on 4 órán keresztül inkubáltam, majd a színváltozás alapján értékeltem. A szén asszimilációs próbákhoz nitrogén (Difco), a nitrogén asszimilációs próbákhoz cukor alapagart (Difco) készítettem 15 ml-es kémcsövekben. Sterilizés után az agarokat vízfürdőben 45 °C-ra hűtöttem. A tenyészetből  $\sim 10^7$  ml<sup>-1</sup> koncentrációjú szuszpenziót készítettem steril vízben. A cukor alapagart 400 µl-nyi szuszpenzióval beoltottam, majd Petri csészébe kiöntöttem. Ezután

a maradék sejtszuszpenzióhoz 2-3 csepp élesztőkivonatot adtam vitaminforrásként és a cukor alapagart e szuszpenzióval oltottam be. Megszilárdulás után az agarlemezek felületére a vizsgálandó cukor, -vagy nitrogénforrással átitatott szűrőpapír-korongokat helyeztem. A glükózerjesztés megfigyelésére 0,1 ml szuszpenzióval Durham csöveket tartalmazó oltottam be. A cikloheximides levessel hasonlóképpen jártam el. Az urealeves kivételével a beoltott csészéket és a csöveket 25 °C-on inkubáltam, majd az eredményeket a 2., a 3. és a 14. napon leolvastam.

### **3.2.7. A csirkehúsból származó izolátumok jellemzésére használt módszerek**

Az izolátumok morfológiai és fiziológiai jellemzésére használt hagyományos módszereket Yarrow (1998) leírása szerint végeztük, a zsírbontó képesség vizsgálata kivételével.

#### **Szénforrás hasznosítás vizsgálata**

Az izolátumok szénforrás hasznosításának vizsgálata folyékony táplevesben történt, amely során az 5 ml nitrogén alap tápleveseket tartalmazó kémcsövekbe egy-egy vizsgálandó szénforrást oldottunk fel. A pozitív kontroll glükózt, a negatív kontroll csak alaplevest tartalmazott. Az élesztőszuszpenziót, amelynek 1-1 ml-ével a kémcsöveket beoltottuk, 24-48 órás tenyészetből desztillált vízzel készítettük. Ezután a kémcsöveket 25 °C-ra rázógéphez (30 rpm) helyeztük. A leolvasást az első és a harmadik héten végeztük fehér papíron lévő fekete, 0,75 mm széles csík segítségével az alábbi módon:

A növekedés fokát a jól felrázott kémcső mögé helyezett fekete csíkkal, szabad szemmel állapítottuk meg. Az értékelés során 3+-t kapott az izolátum tenyésze, ha a csík teljesen eltűnt, 2+-t, ha diffúzsnak láttuk, 1+-t, ha a csík kivehető volt ugyan, de a szélei csak homályosan látszódtak, -, ha a csík pontosan kivehető volt és a szélei élesen látszódtak. Az értékelés segítségével írtuk le a törzseknek a vizsgált szénforrást hasznosító képességét:

+, pozitív, ha 2+ vagy 3+ volt a növekedés 1 hét alatt

latens, ha a 2+ vagy 3+ növekedés gyorsan történt, de csak 2 hét vagy több elteltével

lassú, ha a 2+ vagy 3+ növekedés 2 hét alatt, lassan történt

gyenge, ha a növekedés 1+ volt

-, negatív

változó, ha némelyik törzs negatív volt, némelyik pozitív

### **Nitrogénforrás hasznosítás vizsgálata**

A nitrogénforrás vizsgálatát a 3.2.4. pontban leírt auxanográfiás módszer szerint végeztük szilárd tápagon azzal az eltéréssel, hogy a nitrogénforrásként szolgáló vegyületeket a petricsésze széle mentén egyenlő távolságokban a tápagarra szórtuk szűrőpapírkorong használata helyett. Pozitív kontrollként ammónium-szulfátot használtunk. Az eredményeket a 2., a 4. és a 7. napon olvastuk le.

### **Arbutinbontás vizsgálata**

Az izolátumok arbutinbontó képességének a vizsgálatát a 3.1.4. pontban leírt módon elkészített ferdeagaron végeztük, amelyet beoltás után 25 °C-on tároltunk. Ha az izolátum képes volt bontani az arbutint, az agar 2-7 nap alatt sötétbarnává változott.

### **Vitaminmentes táplevesben történő növekedés vizsgálata**

A vitaminmentes táplevest tartalmazó kémcsöveket egy-egy kacsnyi élesztősejttel oltottuk be, majd 2-3 napig 25 °C-on tároltuk és ennek elteltével leolvastuk.

### **30 °C-on és 37 °C-on való növekedés vizsgálata**

A két hőmérsékleten való növekedés vizsgálatához a glükóz-nitrogénalap táplevest egy-egy kacsnyi élesztősejttel beoltottuk, majd három hétig 30, illetve 37 °C-on tároltuk. A leolvasás az első és a harmadik hét elteltével történt meg.

### **Glükózból való savképzés vizsgálata**

A vizsgálandó sejteket Custer-féle kréta agarra oltottuk és 25 °C-on inkubáltuk. A savat képző izolátumok telepeinek széle körül az agar feltisztult, mert a termelő sav elbontotta a kalcium-karbonátot.

### **Keményítőképzés vizsgálata**

Az élesztőizolátumokat és a 3.1.4. pontban leírt, keményítőképzés vizsgálatára használt tápagart tartalmazó kémcsövekbe az inkubációs idő elteltével 1-2 csepp Lugol

oldatot adtunk és összekevertük a kémcső tartalmát. A pozitív eredményt az élesztőtenyészet sötétkékké vagy sötétzölddé változása jelzi.

### **Urea bontás vizsgálata**

Egy-egy fiolányi Bacto Yeast Urea R Broth-t 3-3 ml desztillált vízben oldottunk, majd 0,5-0,5 ml-t kémcsövekbe pipettáztunk. Egy-két napos élesztőtenyészetből egy-egy kacsnyit a kémcsövekbe oltottunk és azokat 37 °C-on tároltuk. A szuszpenziókat négy órán keresztül fél óránként megnéztük, hogy a színe pirossá változik-e, amely az urea bontását jelezte.

### **Cikloheximid-tűrő képesség**

A sejteket cikloheximid oldatot (0,1 w/v) tartalmazó kémcsövekbe oltottuk, majd az inkubációs idő elteltével a cikloheximid-tűrő képességet a szénforrás asszimiláció vizsgálatánál leírt módon értékeltük.

### **Ecetsav tűrő képesség vizsgálata**

A szénforrás asszimiláció vizsgálatához használt sejtsuszpenzióból egy-egy kacsnyival csíkot húztunk az ecetsavas (1 %) agarlemezek felületére. A lemezeket 25 °C-on tároljuk, majd a 3. és a 6. napon a telepképződést megvizsgáltuk.

### **Zselatinbontás vizsgálata**

A zselatin folyósítás vizsgálatához elkészített lemezek felületén egy-egy kacsnyi élesztősejtet oszlattunk szét és három héten keresztül figyeltük rajtuk az elfolyósodás jeleit.

### **Diazónium Blue B színreakció**

A vizsgált élesztőtörzseket YM agaron tenyésztettük ki, majd egy-két cseppnyi frissen készített, lehűtött DBB reagenst cseppentettünk minden telepre. A pozitív eredményt sötétvörös, illetve lilászvörös szín egy-két percen belüli megjelenése jelezte.

## **Zsíröntő képesség vizsgálata**

Az izolátumok zsíröntő képességének a vizsgálata Marquina és munkatársai (1992) leírása alapján történt. A zsíröntés vizsgálatához használt Gorodkova lemezeket egy-egy csíkban élesztősejtekkel oltottuk be, majd szobahőmérsékleten 10 napig inkubáltuk. Ezután a lemezekre telített réz-szulfát oldatot öntöttünk és 10 percig állni hagytuk. A kinövő telepek körül megjelenő kékes szín a pozitív zsíröntő képességet jelentette.

### **3.2.8. Kromoszómákat tartalmazó agaróz blokk készítése**

A *Geotrichum candidum* élesztőtörzsekből egy-egy kacsnyit 25-25 ml YEPD táplevesbe oltottam és a lombikokat egy éjszakán át 27 °C-on rázattam 180 rpm-el. Másnap a sejteket 2 percig 12000 fordulatszámon centrifugáltam, desztillált vízben mostam, újból centrifugáltam hasonló módon, majd előkezeltem 10 percig 10 mM Tris-HCl-t (tris[hidroximetil]aminometán hidroklorid) (Sigma), 5 mM EDTA-t (selecton B2)(Reanal) és 5 mM DTT-t (ditiotreitol)(Reanal) tartalmazó, 8,0 pH-jú oldattal. Újabb centrifugálás után (2 perc 12000 rpm) a protoplaszt készítéshez 10 ml 1 M szorbitolt és 0,2 gr/ml Lysing enzimet (Sigma) tartalmazó oldatban 37 °C-on 60 percig inkubáltam a sejteket. A protoplasztok képződését mikroszkóp segítségével ellenőriztem, majd 10 percig 2000 rpm-en centrifugáltam. A protoplasztokat 300-300 µl 1 M szorbitolt és 250 mM EDTA-t tartalmazó, 8,0 pH-jú oldatban szuszpendáltam, amiben a protoplasztok gömb alakúak, megmaradnak, nem pukkannak szét. Ezután 50 °C-os vízfürdőbe tettem melegedni. Közben 55 mg LMA-t (alacsony olvadáspontú agaróz) (Promega) felolvasztottam 4,1 ml szorbitolos EDTA oldatban, majd lehűtöttem 50 °C-ra. Ebből az oldatból 400-400 µl-t a protoplasztokra pipettáztam és a blokkkészítőbe mértem az agaróz-protoplaszt keveréket. Az agaróz -20 °C-on 5 perc alatt dermedt meg. A kész blokkokat 1 mg/ml Proteináz-K (Sigma) enzimet tartalmazó S3 oldatba tettem és két napig 50 °C-on inkubáltam. A két nap letelte után a blokkokat 50 mM EDTA-t tartalmazó, 9,0 pH-jú oldattal mostam kétszer. A blokkok tárolása a futtatásig 0,5 mM-os 9,0 pH-jú EDTA oldatban 4°C-on történt.

### **3.2.9. Kariotipizálás**

Az élesztőkromoszómákat tartalmazó agaróz blokkokat 0,9 %-os agaróz gélbe (Promega) ágyaztam, majd a kromoszómákat CHEF II (Bio-Rad) pulzáló mezejű rendszerrel

elektroforetikusan elválasztottam. A szeparálási kondíciók a következők voltak: 0,5 x TBE puffer, először 44 V feszültség, 5000 s átváltás 75 órán keresztül, majd 47 V feszültség, 3000 s átváltás 80 órán keresztül, végül 49 V, 2100 s átváltás 75 órán keresztül. Az elválasztás után az agaróz gél 500 ml etidium-bromidos oldattal (  $5 \mu\text{L mL}^{-1}$  ) kezeltem, majd desztillált vízben mostam. A gél ezután 302 nm-en UV fénnel megvilágítva Gél Doc 1000 digitális kamerával (Bio-Rad) fényképeztem.

### **3.2.10. DNS izolálása**

A DNS izolálása Hoffman és Winston (1987) módszerének módosításával történt. Az élesztősejteket  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 24 órán keresztül tripton-glükóz-élesztőkivonat (TGE) agaron tenyésztettem. A tenyészetből 50 mg sejttömeget kimértem Eppendorf csőbe, majd 1 ml steril desztillált vízben szuszpendáltam a sejteket. A sejtsuszpenziót 14000 rpm fordulatszámon 2 percig centrifugáltam, ezután a felülúszót leöntöttem. Az összegyűjtött élesztősejtekhez 200  $\mu\text{L}$  B puffert, 0.3 g üveggyöngyöt, 200  $\mu\text{L}$  PCIA puffert adtam és 3 percig rázattam. 14000 rpm fordulatszámon 5 percig történő centrifugálás után a felülúszót 1 ml hideg 96 %-os etanolba pipettáztam át. A DNS kicsapódását keveréssel segítettem elő, majd a DNS-t 14000 rpm fordulatszáma, 5 percig tartó centrifugálással összegyűjtöttem. Ezután a DNS-t 200  $\mu\text{L}$  TE pufferben szuszpendáltam. A DNS oldatot  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 percig 3  $\mu\text{L}$  RNázsal kezeltem ( $1\text{ mg mL}^{-1}$ ). Az inkubálás után a DNS-t újból hideg 96%-os etanolban csapattam ki és 14000 rpm fordulatszámon 5 percig centrifugáltam. Végül a DNS-t 50  $\mu\text{L}$  TE pufferben szuszpendáltam.

### **3.2.11. A Random Amplified Polimorphism DNA-PCR (RAPD-PCR) és a microsatellite-PCR paraméterei**

A PCR reakciókat 30  $\mu\text{L}$  reakcióelegyben hajtottam végre, amely 1  $\mu\text{L}$  DyNAzyme<sup>TM</sup> II DNS polimerázt (2 U/ $\mu\text{L}$ )(Finnzymes), 0.75  $\mu\text{L}$  dezoxinukleozid trifoszfát (dNTP) elegyet, (10 mM nukleotidonként) (Finnzymes), 3  $\mu\text{L}$ -t a 10  $\mu\text{M}$ -os primerekből (Bio-Science) és 3  $\mu\text{L}$ -t a tízszeres koncentrációjú reakció pufferből (Finnzymes) tartalmazott. A DNS amplifikálásához Hybad Sprint típusú PCR készüléket használtam a következő paraméterekkel:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 4 percig tartott a bevezető egyszálúsítási szakasz, amelyet 35-ször ismétlődő  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 30 percig tartó egyszálúsítási,  $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő primer kötődési és egy  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 45 percig tartó primer hosszabbodási szakaszból álló ciklus követett. Végül a DNS megsokszorozását egy  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 7 percig tartó végső lánchosszabbítás zárja.

### **3.2.12. A 18S rDNS és az azzal határos ITS1 részek megsokszorozásához használt polimeráz láncreakció (PCR) paraméterei**

A 18S rDNS és az azzal határos ITS1 részek megsokszorozásához NS1 és ITS2 primereket (Bio-Science) használtam (Dlauchy et al, 1999). A 15 µl reakcióelegy a következő komponenseket tartalmazta: 3 µl DNS, 0.5 µl DyNAzyme<sup>TM</sup> II DNS polimerázt (2 U/µl)(Finnzymes), 0.5 µl dezoxinukleozid trifoszfát (dNTP) elegyet (Finnzymes), 3 µl-t a tízszeres koncentrációjú reakció pufferből (Finnzymes), 3 µl 25 mM koncentrációjú MgCl<sub>2</sub> (Promega) és 1 µl a 10 µM koncentrációjú primerekből. A DNS megsokszorozását Hybad Sprint típusú PCR készülékkel hajtottam végre, az alábbi paraméterekkel: a bevezető egyszálúsítási szakasz 3 percig tartott 95 °C-on, amely után 35-ször ismétlődő ciklus követett. Ez a ciklus egy 40 másodpercig tartó 94 °C-os egyszálúsítási szakaszból, egy 40 másodpercig tartó 58 °C-os primer kötődési szakaszból és egy 2 percig tartó 72 °C-os primer hosszabbodási szakaszból állt. Ezt egy 3 percig tartó 72 °C-os végső lánchosszabbítás követett.

### **3.2.13. Az amplikonok enzimes hasításának a paraméterei**

A polimeráz láncreakció (PCR) segítségével megsokszorozott amplikonok feldarabolásához *Hae III* és *Msp I* restrikciós endonukleázokat (Promega) használtam. A 3-3 µl PCR termék hasítása 15 µl reakcióelegyben történt, amely a következő alkotókat tartalmazta: 0.2 µl (10 U µL<sup>-1</sup>) restrikciós endonukleáz, 0.15 µl (10 mg mL<sup>-1</sup>) bovin szérum albumin (Promega) és 1.5 µl tízszeres koncentrációjú C puffer (Promega). A reakcióelegyet 4 órát inkubáltam 37 °C-on.

### **3.2.14. Gélelektroforézis és géلكiértékelés**

Mind a ribotipizálás során kapott fragmentek, mind a RAPD analízis során kapott amplikonok gélelektroforézise 1.2 % -os agaróz gélben (Promega) történt, horizontális futtatókád (Promega) segítségével VI lépcsős DNS markerrel 0.5 x TBE pufferben. Futtatás után a géleket etidium-bromiddal megfestettem, UV fénnel megvilágítottam és a kapott gélképeket GelDoc 2000 System (Biorad) segítségével számítógépben rögzítettem. A gélmintázatok alapján a Molecular Analysis programmal, UPGMA módszerrel dendogramot készítettem.

### **3.2.15. A szekvenálathoz használt 26S rDNS, a vele szomszédos ITS2 szakasz és az 5,8 rDNS megsokszorozásának paraméterei**

A 26S rDNS, a vele szomszédos ITS2 szakasz és az 5,8 rDNS megsokszorozásához az ITS3 (White et al, 1990) és az LR5 (Vilgalys and Hester, 1990) primert használtuk. A 15 µl reakcióelegy a következő komponenseket tartalmazta: 1 µl DNS, 1 unit Taq DNS polimeráz (Promega), 0,2 mM mindegyik dezoxinukleozid trifoszfátból, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH=9,0), 1% Triton X 100, 2 mM MgCl<sub>2</sub> és 20 ng mindkét primerből. A DNS megsokszorozását Techne Progene Thermal Cycler típusú PCR készülékkel végeztük az alábbi paraméterek szerint: a bevezető egyszálúsítási szakasz 3 percig tartott 95 °C-on, amely után 35-ször ismétlődő ciklus következett. Ez a ciklus egy 1 percig tartó 94 °C-os egyszálúsítási szakaszból, egy 1 percig tartó 60 °C-os primer kötődési szakaszból és egy 2 percig tartó 72 °C-os primer hosszabbodási szakaszból állt. Ezt egy 6 percig tartó 72 °C-os végső lánchosszabbítás követett.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Élesztők izolálására szolgáló táptalajok összehasonlítása

Elsőként szelektív táptalajokat hasonlítottam össze az élesztők izolálására, számlálására való alkalmasságuk szempontjából. A vizsgálatot roquefort típusú sajtból végeztem és a cél a további vizsgálatokhoz a legmegfelelőbb táptalaj kiválasztása volt.

A 11 vizsgált táptalaj összehasonlítása során kapott teljes telepszám, amelyet 10-10 g sajt homogenizátumából nyertem, három almintából kétszeres ismételtsben, a 15. táblázatban látható.

15. táblázat: Élesztő-, penész-, és baktérium telepszámok az egyes táptalajokon

| TÁPTALAJ ISMÉTLÉSEK |   | 1. MINTA           |                    |                    | 2. MINTA           |                    |                    | 3. MINTA           |                    |                    |
|---------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                     |   | Élesztő telepszám  | Penész telepszám   | Bakt. telepszám    | Élesztő telepszám  | Penész telepszám   | Bakt. telepszám    | Élesztő telepszám  | Penész telepszám   | Bakt. telepszám    |
| RBC                 | A | $1,18 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $1,32 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $2,04 \times 10^7$ | 0                  | 0                  |
|                     | B | $9,50 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $8,80 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $1,18 \times 10^7$ | 0                  | 0                  |
| DRBC                | A | $1,18 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $1,50 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $1,13 \times 10^7$ | 0                  | 0                  |
|                     | B | $8,70 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $9,40 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $1,26 \times 10^7$ | 0                  | 0                  |
| DG18                | A | $1,38 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $1,36 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $1,43 \times 10^7$ | 0                  | 0                  |
|                     | B | $1,33 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $1,44 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $1,33 \times 10^7$ | 0                  | 0                  |
| MES                 | A | $1,09 \times 10^7$ | 0                  | $5,00 \times 10^5$ | $1,95 \times 10^7$ | 0                  | $1,00 \times 10^6$ | $1,20 \times 10^7$ | 0                  | $8,00 \times 10^5$ |
|                     | B | $1,17 \times 10^7$ | 0                  | $5,00 \times 10^5$ | $1,20 \times 10^7$ | 0                  | $8,00 \times 10^5$ | $1,00 \times 10^7$ | 0                  | $6,00 \times 10^5$ |
| MEP                 | A | $6,80 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $1,12 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $8,80 \times 10^6$ | 0                  | 0                  |
|                     | B | $7,40 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $6,20 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $1,20 \times 10^7$ | 0                  | 0                  |
| MOL                 | A | $5,00 \times 10^6$ | $1,00 \times 10^6$ | 0                  | $1,12 \times 10^7$ | $1,40 \times 10^6$ | 0                  | $6,10 \times 10^6$ | $1,00 \times 10^5$ | 0                  |
|                     | B | $6,20 \times 10^6$ | $2,00 \times 10^5$ | 0                  | $9,8 \times 10^6$  | $1,10 \times 10^6$ | 0                  | $7,30 \times 10^6$ | $9,00 \times 10^5$ | 0                  |
| OGGY                | A | $5,90 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $1,32 \times 10^7$ | 0                  | 0                  | $1,00 \times 10^7$ | 0                  | 0                  |
|                     | B | $4,00 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $6,90 \times 10^6$ | 0                  | 0                  | $9,60 \times 10^6$ | 0                  | 0                  |
| MEOX                | A | $1,20 \times 10^6$ | 0                  | nsz                | $2,20 \times 10^6$ | $1,00 \times 10^5$ | $1,00 \times 10^5$ | $9,10 \times 10^6$ | $2,00 \times 10^5$ | $4,00 \times 10^5$ |
|                     | B | $1,50 \times 10^6$ | $1,00 \times 10^5$ | nsz                | $3,80 \times 10^6$ | $3,00 \times 10^5$ | $4,00 \times 10^5$ | $7,5 \times 10^6$  | $4,00 \times 10^5$ | $4,00 \times 10^5$ |
| MOPR                | A | $1,00 \times 10^6$ | $1,00 \times 10^5$ | 0                  | $1,50 \times 10^6$ | nsz                | 0                  | $1,60 \times 10^6$ | $2,00 \times 10^5$ | 0                  |
|                     | B | $3,10 \times 10^6$ | $3,00 \times 10^5$ | 0                  | nsz                | $5,00 \times 10^5$ | 0                  | $8,00 \times 10^5$ | $1,00 \times 10^5$ | 0                  |
| YGCO                | A | $7,30 \times 10^6$ | 9                  | 0                  | $2,70 \times 10^6$ | $4,00 \times 10^5$ | 0                  | $1,05 \times 10^7$ | $6,00 \times 10^5$ | 0                  |
|                     | B | $7,20 \times 10^6$ | 3                  | 0                  | $1,08 \times 10^7$ | $1,00 \times 10^6$ | 0                  | $9,00 \times 10^6$ | $4,00 \times 10^5$ | 0                  |
| YEE                 | A | $3,30 \times 10^6$ | 0                  | nsz                | $5,80 \times 10^6$ | 0                  | nsz                | nsz                | 0                  | $5,80 \times 10^6$ |
|                     | B | $5,20 \times 10^6$ | 0                  | nsz                | $2,00 \times 10^6$ | 0                  | nsz                | nsz                | 0                  | $5,30 \times 10^6$ |

Minden telepszám a  $10^{-5}$  higítási fokból származik

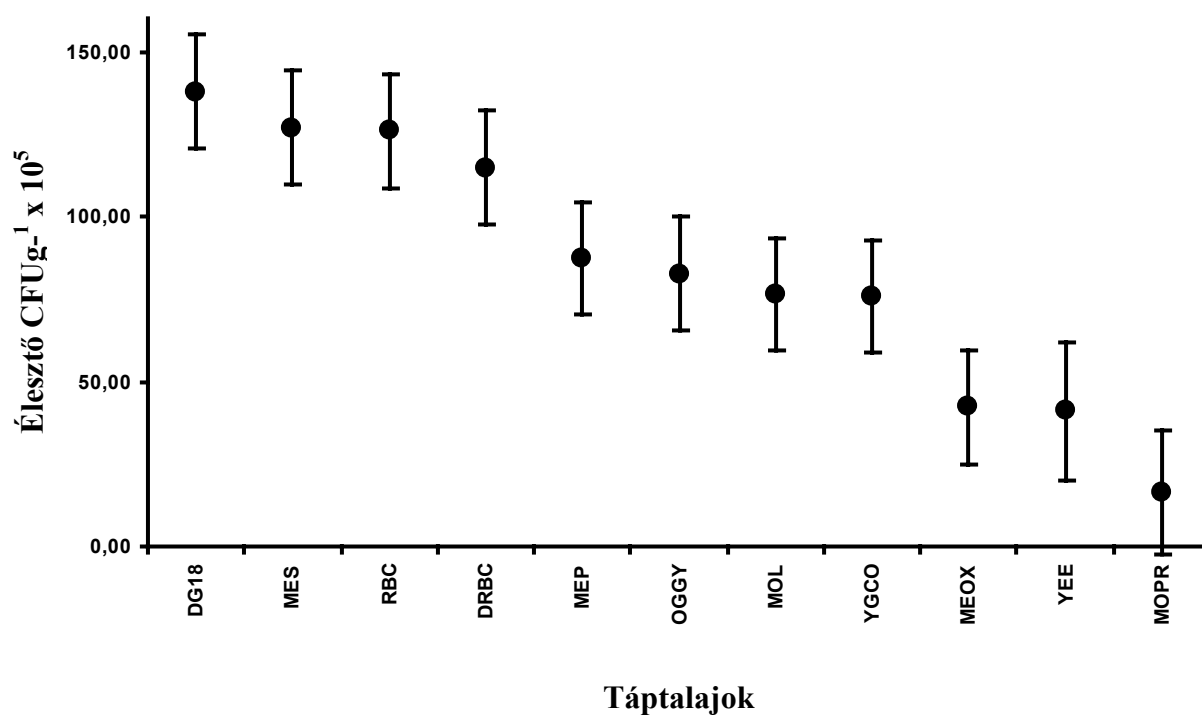
nsz: nem számlálható

Az egyes táptalajok élesztő telepszámait kéttényezős varianciaanalízissel hasonlítottam össze (16. táblázat).

16. táblázat: A táptalajok élesztőszámának összehasonlítása kéttényezős varianciaanalízis segítségével.

| Táptalajok | Minták száma | Középértékek<br>(x 10 <sup>5</sup> ) | Egyforma csoportok<br>(p>0.05) |
|------------|--------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| MOPR       | 5            | 16,00                                | X                              |
| YEE        | 4            | 40,75                                | XX                             |
| MEOX       | 6            | 42,16                                | XX                             |
| YGCO       | 6            | 79,16                                | XX                             |
| MOL        | 6            | 76,00                                | XX                             |
| OGGY       | 6            | 82,66                                | XX                             |
| MEP        | 6            | 87,33                                | XX                             |
| DRBC       | 6            | 114,66                               | XX                             |
| RBC        | 6            | 125,83                               | X                              |
| MES        | 6            | 126,83                               | X                              |
| DG 18      | 6            | 137,83                               | X                              |

A különböző táptalajok közötti átfedések a 3. ábrán láthatóak, amelyről az élesztő telepszámok átlagértékei is leolvashatók 95% konfidencia intervallum mellett.



3. ábra: Az élesztő telepszámok átlagértékei 95%-os konfidencia intervallum mellett

A 16. táblázaton és a 3. ábrán is jól látható, hogy a táptalajok három homogén csoportot alkottak egymást átfedő konfidencia intervallumokkal. A csoportok között nem volt szignifikáns differencia megfigyelhető. Az első csoport a DG 18, a MES, az RBC és a DRBC táptalajokat tartalmazta, amelyek esetében az élesztő telepszámok középértéke valamivel több volt, mint  $10^7$  CFUg<sup>-1</sup>. Ezekkel a táptalajokkal összehasonlítva az élesztő telepszám szignifikánsan kevesebbnek mutatkozott a MEOX, a YEE és a MOPR táptalajok által alkotott csoport esetén. A MEP, az OGGY, a MOI és a YGCO egy középső csoportot alkot a másik két csoport között.

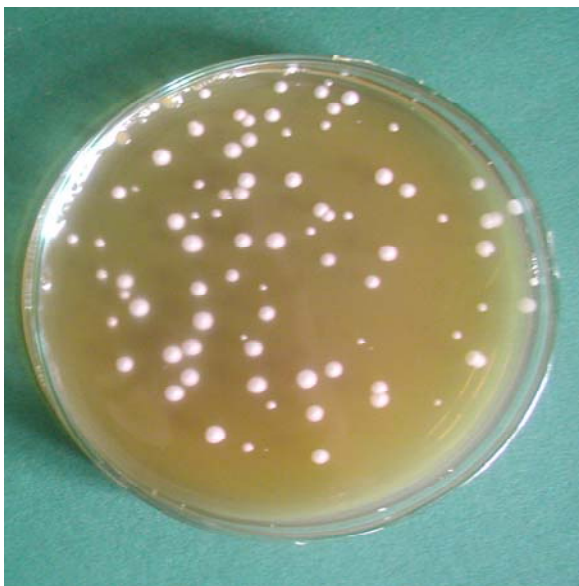
A táptalajokról készült képeken megfigyelhető, hogy a bifenil tartalmú MEP (malt extract biphenyl) (4. ábra), az oxitetraciklin és gentamicin tartalmú OGGY (oxytetracycline gentamicin glucose yeast extract) (5. ábra), a kloramfenikolt és glicerint tartalmazó DG 18 (dichloran 18 % glycerol) (6. ábra), dikloránt, bengál rózsát és kloramfenikolt tartalmazó DRBC (dichloran rose bengal chloramphenicol) (7. ábra) és a bengál rózsát és kloramfenikolt tartalmazó RBC (rose bengal chloramphenicol) (8. ábra) táptalajokon a baktériumok és a penészek kifejlődése teljesen gátolt, az élesztők növekedése pedig megfelelő. A DRBC és az RBC táptalajon az élesztőtelepek színbeli eltérést is mutatnak egymástól.



4. ábra: Malt extract biphenyl (MEP) agar



5. ábra: Oxytetracycline gentamicin glucose yeast extract (OGGY) agar



6. ábra: Dichloran 18 % glycerol (DG 18) agar



7. ábra: Dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) agar



8. ábra: Rose bengal chloramphenicol (RBC) agar

A foszfomolibdénsav tartalmú MOL (molybdate) (9. ábra) és a foszfomolibdénsavat és kalcium-propionátot tartalmazó MOPR (molybdate with calcium propionate) (10. ábra), illetve az ökörepe tartalmú MEOX (malt extract agar with ox-bile) (11. ábra) és a YGCO (yeast extract glucose chloramphenicol oligomycin) (12. ábra) táptalajokon a penészek elterjedése nem gátolt, az élesztőtelepeket a penészek nagymértékben belepék.



9. ábra: Molybdate (MOL) agar



10. ábra: Molybdate with calcium propionate  
MOPR) agar



11. ábra: Malt extract agar with ox-bile (MEOX)

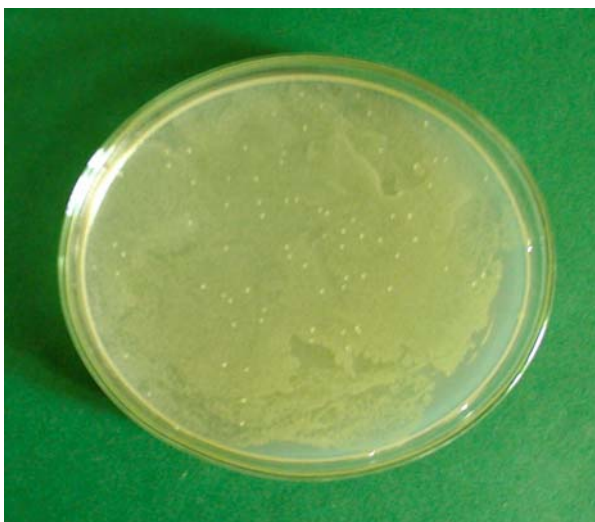


12. ábra: Yeast extract glucose chloramphenicol oligomycin (YGCO) agar

Az oxitetraciklin és nátrium-klorid tartalmú MES (malt extract agar supplemented with sodium-chloride) (13. ábra) és az eugenolt tartalmazó YEE (yeast extract agar with eugenol) (14. ábra) táptalajokon a baktériumok kifejlődése nem volt gátolt, sőt sok esetben a YEE agar felületét teljesen elnyálkásították.



13. ábra: Malt extract agar supplemented with sodium-chloride (MES)



14. ábra: Yeast extract with eugenol (YEE) agar

#### 4.2. Élesztőizolátumok gyűjtése különféle hazai tejtermékekből

Az élesztőizolátumokat különféle típusú és különböző gyártótól származó tejtermékből, így lágy- és kemény sajtokból, túrókból, Túró Rudiból gyűjtöttem. Az izoláláshoz az előzőekben megfelelőnek talált öt táptalaj (MEP, OGGY, DG18, RBC, DRBC) közül a nehéz volt az izoláláshoz használt táptalaj kiválasztása, mivel mindegyik eleget tett az élesztők izolálására alkalmas táptalajokkal szemben támasztott követelményeknek. Közülük a kereskedelmi forgalomban por alakban is kapható diklorán bengál rózsza (DRBC) táptalajt csupán könnyű elkészíthetőségéért választottam. A törzsek nevei utalnak arra, hogy az izolátumok milyen tejtermékből és melyik gyártótól származnak (17. táblázat).

17. táblázat: Élesztőizolátumok származása Magyarországon gyártott tejtermékek mintáiból

| <b>Törzs</b> | <b>Tejtermék típus</b>   | <b>Törzs</b> | <b>Tejtermék típus</b> |
|--------------|--------------------------|--------------|------------------------|
| bck I/1      | Bakony camembert sajt    | nut III/2    | Nádudvari tehéntúró    |
| bck I/2      | Bakony camembert sajt    | nut IV/1     | Náduvari tehéntúró     |
| bck I/3      | Bakony camembert sajt    | nut /gc      | Nádudvari tehéntúró    |
| bc b I       | Bakony camembert sajt    | nut IV/ gc   | Nádudvari tehéntúró    |
| bck II       | Bakony camembert sajt    | sott I/1     | Sole tehéntúró         |
| bck III/1    | Bakony camembert sajt    | sott I/2     | Sole tehéntúró         |
| bck III/2    | Bakony camembert sajt    | tott I/1     | Tolle tehéntúró        |
| bc b III     | Bakony camembert sajt    | tott I/2     | Tolle tehéntúró        |
| bck IV       | Bakony camembert sajt    | tott I/gc    | Tolle tehéntúró        |
| bcgc 1       | Bakony camembert sajt    | tott II/gc   | Tolle tehéntúró        |
| tck I        | Tihany camembert sajt    | tott II/2    | Tolle tehéntúró        |
| tck II       | Tihany camembert sajt    | mitt I/2     | Mizzo tehéntúró        |
| ms I         | Márványsajt              | mitt /gc     | Mizzo tehéntúró        |
| ms II/1      | Márványsajt              | vtt          | Veszprémtej tehéntúró  |
| ms II/3      | Márványsajt              | vtt /gc      | Veszprémtej tehéntúró  |
| ms II/4      | Márványsajt              | bakt I       | Bakony tehéntúró       |
| ms II/5      | Márványsajt              | bakt I/gc    | Bakony tehéntúró       |
| ms III/1     | Márványsajt              | es 1         | Ementáli sajt          |
| ms III/2     | Márványsajt              | ts 1         | Trappista sajt         |
| ms IV/1      | Márványsajt              | ts 2         | Trappista sajt         |
| ms IV/2      | Márványsajt              | ts 3/1       | Tappista sajt          |
| nbht I/2     | Nagybánhegyesi tehéntúró | ts 3/2       | Trappista sajt         |
| nbht II/1    | Nagybánhegyesi tehéntúró | ts II/1      | Trappista sajt         |
| nbht III/1   | Nagybánhegyesi tehéntúró | ts II/2      | Tappista sajt          |
| nbht IV/gc   | Nagybánhegyesi tehéntúró | ts III/1     | Trappista sajt         |
| nbht V/1     | Nagybánhegyesi tehéntúró | ts III/2     | Trappista sajt         |
| nbht V/gc    | Nagybánhegyesi tehéntúró | ks 1         | Kecskesajt             |
| nut I        | Nádudvari tehéntúró      | ks I/gc      | Kecskesajt             |
| nut II/1     | Nádudvari tehéntúró      | ps 1/gc      | Pálpusztai sajt        |
| nut II/2     | Nádudvari tehéntúró      | ps 2         | Pálpusztai sajt        |
| nut III/1    | Nádudvari tehéntúró      | rcs 1        | Túró Rudi              |
| nut III/2    | Nádudvari tehéntúró      | rl 1         | Túró Rudi              |
| nut IV/1     | Náduvari tehéntúró       | rt 1         | Túró Rudi              |

**4.3. A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása hagyományos módszerekkel, az egyszerűsített identifikációs rendszer (SIM; Deák, 1998) szerint**

Vizsgálataim egyik fő célja volt, hogy átfogó képet nyújtsak különböző, Magyarországon gyártott tejtermékek élesztőbiótájának összetételéről.

Az izolátumok identifikálásához a hagyományos módszereket alkalmazó egyszerűsített identifikációs rendszert használtam (Deák, 1998). A módszer mindössze 19 jellemzőt alkalmaz. Közülük 6 alapróba alapján, az első pozitív válasz szerint 7 csoport egyikébe tudtam az izolátumokat sorolni. A csoportosítás az ureázreakció, a nitrát- és eritritasszimiláció, a cikloheximid-rezisztencia, a cellobióz- és mannitasszimiláció alapján történt (18. táblázat).

*18. táblázat: Élesztőizolátumok csoportosítása az egyszerűsített identifikációs eljárásnál (SIM) alkalmazott fő jellemzők alapján*

| Csoportok         | Jellemzők                                                       | Élesztőtőizolátumok forrásai                                                                                                                                                    | Élesztőtőizolátumok jele                                                                                                                              |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. csoport</b> | <b>Ureáz pozitív élesztők</b>                                   | "Tihany" camembert sajt<br>Márvány sajt<br>"Sole" tehéntúró                                                                                                                     | tck II,<br><br>ms II/4, ms II/5,<br>sott I/2                                                                                                          |
| <b>2. csoport</b> | <b>Nitrátasszimiláló élesztők</b>                               | -                                                                                                                                                                               | -                                                                                                                                                     |
| <b>3. csoport</b> | <b>Eritritet asszimiláló élesztők</b>                           | "Bakony" camembert sajt<br><br>Nagybánhegyesi tehéntúró<br>"Márvány" sajt<br><br>"Trappista" sajt<br>"Ementáli" sajt                                                            | bck I./1, bck I/3, bcb I, bck III./1<br>bck IV,<br>nbht III/1<br><br>ms 1, ms II/1, ms II/3, ms III/1,<br>ms IV/1, ms IV/2,<br>ts 2, ts III/2<br>es 1 |
| <b>4. csoport</b> | <b>Cikloheximid rezisztens, cellobiózt asszimiláló élesztők</b> | "Bakony" camembert sajt<br>Nádudvari tehéntúró<br>Nagybánhegyesi tehéntúró<br>Veszprémtej tehéntúró<br>kecskesajt<br>"Trappista" sajt<br>"Tolle" tehéntúró<br>"Pálpusztai sajt" | bck II, bcb III,<br>nut I,<br>nbht I/2<br><br>vtt<br>ks 1,<br>ts II/1, ts III/1, ts 3/2<br>tott I/1<br>ps 2                                           |

| Csoportok  | Jellemzők                                                  | Élesztőtízelátumok forrásai                                                                                                                                               | Élesztőtízelátumok jele                                                                                                                                                        |
|------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5. csoport | Cikloheximid rezisztens, cellobiózt nem asszíláló élesztők | "Bakony" camembert sajt<br>"Túró rudi"<br>Nagybánhegyesi tehéntúró<br>"Tolle" tehéntúró<br>Veszprémtej tehéntúró<br>"Bakony" tehéntúró<br>Kecskesajt<br>„Mizzo” tehéntúró | bck I/2, bcgc1, bck III/2<br>rcs 1, rl 1, rt1,<br>nbht II/1, nbht IV/gc, nbht V/1, nbht V/gc<br>tott I/2, tott I/gc, tott II/gc<br>vtt/gc<br>bakt I/gc<br>ks I/gc<br>Mitt I/ 2 |
| 6. csoport | Cikloheximid érzékeny, mannitot asszímiláló élesztők       | "Bakony" camembert sajt<br>"Trappista" sajt<br>"Sole" tehéntúró<br>Nádudvari tehéntúró<br>"Mizzo" tehéntúró<br>Pálpusztai sajt                                            | tck I<br>ts1, ts 3/1, ts II/2<br>sott I/1<br>nut III/2, nut/gc, nut IV/gc<br>mitt/gc<br>pps/gc                                                                                 |
| 7. csoport | Cikloheximidre érzékeny, mannitot nem asszímiláló élesztők | "Bakony" tehéntúró<br>Nádudvari tehéntúró<br><br>"Márvány" sajt<br>"Tolle" tehéntúró                                                                                      | bakt I,<br>nut II/1, nut II/2, nut III/1,<br>nut IV/1,<br>ms III/2<br>tott II/2                                                                                                |

A csoportokon belül további állandó próbákkal történt az azonosítás, néhány esetben pedig további vizsgálatokra volt szükség a 19 alapvizsgálatot kiegészítve. Az eredményeket az alapszámok szerint a 19.-24. táblázat mutatja be.

19. táblázat: Ureáz pozitív élesztők főbb azonosítási jellemzői

1. csoport

| Izolátumok jele | Jellemzők |   |   |    |    |   |    | Faji azonosítás                 |
|-----------------|-----------|---|---|----|----|---|----|---------------------------------|
|                 | Nt        | R | G | Mt | Me | D | Hi |                                 |
| tck II          | -         | + | + | -  | +  | - | -  | <i>Cryptococcus laurentii</i>   |
| ms II/4         | -         | - | + | +  | -  | - | +  | <i>Cryptococcus curvatus</i>    |
| ms II/5         | -         | + | - | -  | -  | - | -  | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| sott I/2        | -         | + | + | +  | +  | - | -  | <i>Bulleromyces albus</i>       |
| bck IV          | -         | - | + | +  | -  | - | +  | ?                               |

A 19. - 24. táblázatokban használt rövidítések magyarázata: Asszímilációs próbák: Ce: cellobióz, Ct: citrát, G: galaktóz, Kd: kadaverin, Kg: 2-ketoglükonát, Km: keményítő, M: maltóz, Me: melibióz, Mg:  $\alpha$ -metilglükózid, Mt: mannit, Nt: nitrát, R: raffinóz, Növekedési próbák: Cik: cikloheximid, Erjesztés: D: glükóz, Alaki tulajdonságok: Áh: álhifa, Hi: hifa

20. táblázat: Eritritet asszimiláló élesztők főbb azonosítási jellemzői

3. csoport

| Izolátumok jele | Jellemzők |   |   |   |   |    |    |    |    | Faji azonosítás                        |
|-----------------|-----------|---|---|---|---|----|----|----|----|----------------------------------------|
|                 | Cik       | D | M | R | G | Me | Mg | Hi | Áh |                                        |
| bck I/1         | +         | - | - | - | - | -  | -  | +  | +  | <i>Yarrowia</i><br><i>lipolytica</i>   |
| bck I/3         | +         | - | - | - | - | -  | -  | +  | +  | <i>Yarrowia</i><br><i>lipolytica</i>   |
| bcb I           | +         | - | - | - | - | -  | -  | +  | +  | <i>Yarrowia</i><br><i>lipolytica</i>   |
| bck III/1       | +         | - | - | - | - | -  | -  | +  | +  | <i>Yarrowia</i><br><i>lipolytica</i>   |
| ms III/ 2       | +         | - | - | - | - | -  | -  | +  | +  | <i>Yarrowia</i><br><i>lipolytica</i>   |
| nbht III/1      | +         | - | - | - | - | -  | -  | +  | +  | <i>Yarrowia</i><br><i>lipolytica</i>   |
| ms 1            | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |
| ms II/1         | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |
| ms II/3         | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |
| ms III/1        | -         | - | + | - | - | -  | +  | +  | +  | <i>Candida mesenterica</i>             |
| ms IV/1         | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |
| ms IV/2         | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |
| ts 2            | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |
| ts II/1         | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |
| ts III/2        | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |
| es 1            | -         | - | + | + | + | +  | +  | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i> |

21. táblázat: Cikloheximid rezisztens, cellobiózt asszimiláló élesztők főbb azonosítási jellemzői

4. csoport

| Izolátumok jele | Jellemzők |   |   |    |    |    |   |    |    | Faji azonosítás                          |
|-----------------|-----------|---|---|----|----|----|---|----|----|------------------------------------------|
|                 | Mt        | R | G | Kg | Ct | Mg | D | Km | Hi |                                          |
| bck II          | +         | + | + | +  | +  | +  | - | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i>   |
| bcb III         | +         | + | + | +  | +  | +  | - | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i>   |
| nut I           | +         | + | + | -  | +  | +  | + | -  | -  | <i>Kluyveromyces</i><br><i>lactis</i>    |
| vtt             | -         | + | + | -  | -  | -  | + | -  | -  | <i>Dekkera</i><br><i>bruxellensis</i>    |
| ks 1            | +         | + | + | -  | -  | -  | + | -  | -  | <i>Kluyveromyces</i><br><i>marxianus</i> |
| ts III/1        | +         | - | + | +  | -  | +  | + | -  | -  | <i>Kluyveromyces</i><br><i>lactis</i>    |
| ts 3/2          | +         | - | + | +  | -  | -  | + | -  | -  | <i>Candida</i><br><i>maltosa</i>         |
| tott I/1        | +         | + | + | -  | -  | -  | + | -  | -  | <i>Kluyveromyces</i><br><i>lactis</i>    |
| pps 2           | +         | + | + | +  | +  | +  | - | -  | -  | <i>Debaryomyces</i><br><i>hansenii</i>   |
| nbht I/2        | +         | - | + | -  | -  | +  | + | -  | -  | ?                                        |

22. táblázat: Cikloheximid rezisztens, cellobiózt nem asszimiláló élesztők főbb jellemzői  
5. csoport

| Izolátumok jele | Jellemzők |   |   |   |    |    |    |    |    |   |    | Faji azonosítás                          |
|-----------------|-----------|---|---|---|----|----|----|----|----|---|----|------------------------------------------|
|                 | Mt        | M | R | G | Kg | Kd | Me | Km | Mg | D | Hi |                                          |
| bck I/2         | +         | + | - | + | -  | +  | -  | -  | -  | + | -  | <i>Candida</i><br><i>catenulata</i>      |
| bcgc 1          | +         | - | - | + | -  | +  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| bck III/2       | +         | + | - | + | -  | +  | -  | -  | +  | + | -  | <i>Candida</i><br><i>parapsilopsis</i>   |
| res 1           | +         | - | - | + | -  | +  | -  | -  | -  | - | -  | <i>Candida</i><br><i>catenulata</i>      |
| rl 1            | +         | - | - | + | -  | +  | -  | -  | -  | - | -  | <i>Candida</i><br><i>catenulata</i>      |
| rt 1            | -         | - | + | + | -  | -  | -  | -  | -  | + | -  | <i>Saccharomyces</i><br><i>exiguus</i>   |
| nbht II/1       | -         | - | + | + | -  | +  | -  | -  | -  | + | -  | <i>Kluyveromyces</i><br><i>marxianus</i> |
| nbht IV /gc     | +         | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| nbht V/1        | -         | - | + | + | -  | +  | -  | -  | -  | + | -  | <i>Kluyveromyces</i><br><i>marxianus</i> |
| nbht V/gc       | +         | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| tott I/2        | -         | - | + | + | -  | -  | -  | -  | -  | + | -  | <i>Candida milleri</i>                   |
| tott I/gc       | +         | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| tott II/gc      | +         | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| vtt/gc          | +         | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| bakt I/gc       | +         | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| ks 1/gc         | +         | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| bcgc 1          | +         | - | - | + | -  | -  | -  | -  | -  | - | +  | <i>Geotrichum</i><br><i>candidum</i>     |
| mitt I/ 2       | -         | - | + | + | -  | -  | -  | -  | -  | + | -  | <i>Candida milleri</i>                   |

23. táblázat: Cikloheximid érzékeny, mannitot asszimiláló főbb élesztők jellemzői

6. csoport

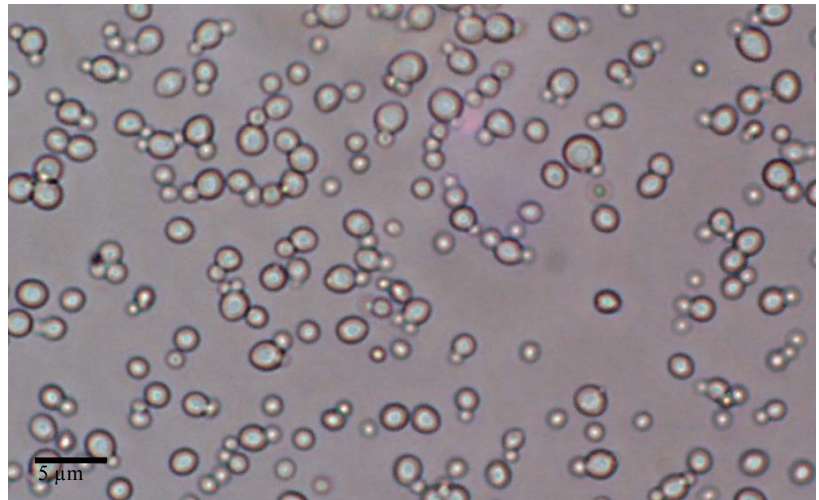
| Izolátumok jele | Jellemzők |   |    |    |   |    |    |    |   |    | Faji azonosítás                |
|-----------------|-----------|---|----|----|---|----|----|----|---|----|--------------------------------|
|                 | M         | R | Ct | Kd | G | Me | Ce | Kg | D | Áh |                                |
| tck I           | +         | - | -  | +  | + | -  | +  | -  | + | +  | <i>Metschnikowia reukaufii</i> |
| ts 1            | +         | - | +  | +  | + | -  | +  | +  | - | +  | <i>Pichia carsonii</i>         |
| ts 3/1          | +         | + | +  | +  | + | -  | +  | +  | - | -  | <i>Debaryomyces hansenii</i>   |
| ts II/2         | -         | - | -  | -  | + | -  | -  | +  | + | -  | <i>Torulaspora delbrueckii</i> |
| sott I/1        | -         | - | -  | +  | + | -  | -  | -  | - | +  | <i>Candida rugosa</i>          |
| nut III/2       | +         | - | -  | +  | + | -  | -  | +  | + | +  | <i>Candida sake</i>            |
| nut /gc         | -         | - | +  | +  | + | -  | -  | -  | - | -  | <i>Geotrichum candidum</i>     |
| mitt/gc         | -         | - | +  | +  | + | -  | -  | -  | - | -  | <i>Geotrichum candidum</i>     |
| pps/gc          | -         | - | +  | +  | + | -  | -  | -  | - | -  | <i>Geotrichum candidum</i>     |
| nut IV/gc       | -         | - | +  | +  | + | -  | -  | -  | - | -  | <i>Geotrichum candidum</i>     |

24. táblázat: Cikloheximidre érzékeny, mannitot nem asszimiláló élesztők főbb jellemzői  
7. csoport

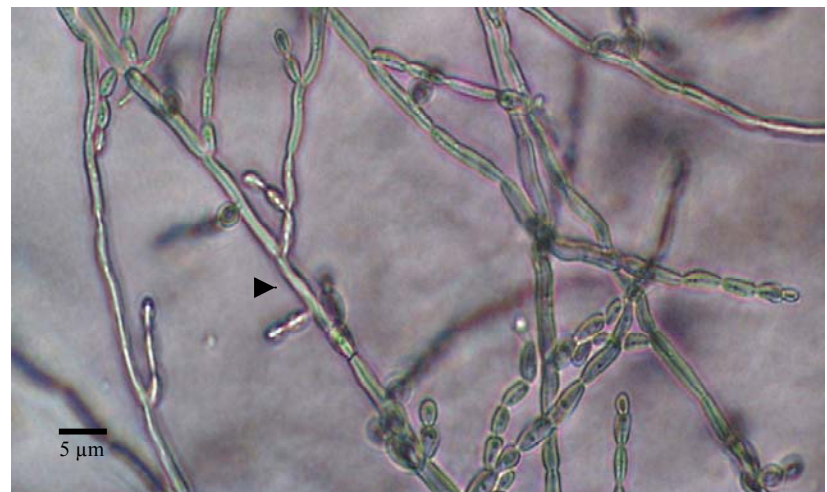
| Izolátumok<br>jele | Jellemzők |    |   |    |    |    |   |    |    |   | Faji azonosítás                   |
|--------------------|-----------|----|---|----|----|----|---|----|----|---|-----------------------------------|
|                    | M         | Mt | R | Kd | Me | Kg | G | Mg | Ct | D |                                   |
| bakt I             | -         | -  | - | +  | -  | -  | - | -  | -  | - | <i>Pichia<br/>membranifaciens</i> |
| nut II/1           | -         | -  | - | +  | -  | -  | - | -  | +  | + | <i>Pichia<br/>fermentans</i>      |
| nut II/2           | -         | -  | - | +  | -  | -  | - | -  | -  | + | <i>Pichia<br/>kluyverii</i>       |
| nut III/1          | -         | -  | - | +  | -  | -  | - | -  | -  | + | <i>Pichia<br/>membranifaciens</i> |
| nut IV/1           | -         | -  | - | -  | -  | -  | - | -  | -  | + | <i>Candida<br/>glabrata</i>       |
| ms III/2           | -         | -  | - | +  | -  | -  | - | -  | -  | - | <i>Pichia<br/>membranifaciens</i> |
| tott II/2          | -         | -  | - | +  | -  | -  | - | -  | -  | + | <i>Pichia<br/>kluyverii</i>       |

A kétes azonosításokat ismétlésekkel, illetve API 32 ID gyorseszttel erősítettem meg. A *Trichosporon inkin* (bck IV) és a *Candida lusitanae* (nbht I/ 2) izolátumokat csak API 32 ID gyorseszttel (Biomerieux) sikerült azonosítani, mivel ezek nem szerepelnek az egyszerűsített identifikációs módszer (SIM) adatbázisában.

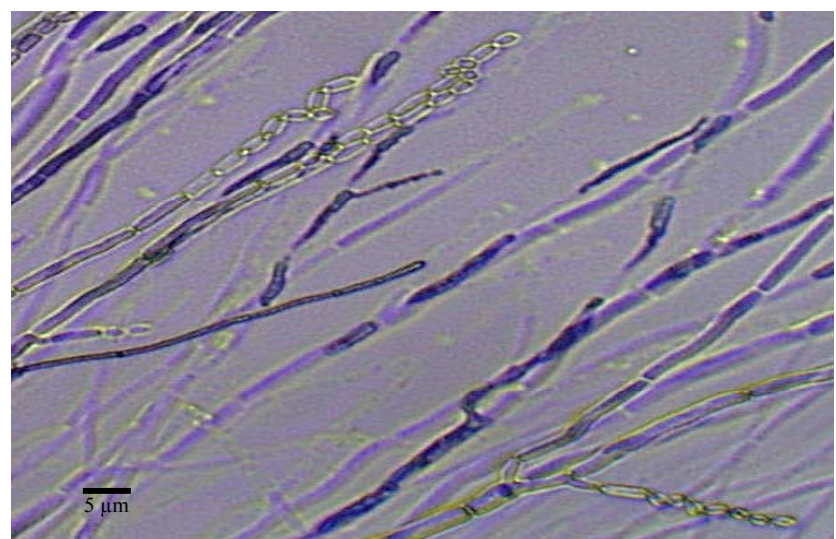
A 19.- 24. táblázatok alapján látható, hogy az izolátumok között leggyakrabban a *Debaryomyces hansenii*, a *Geotrichum candidum* és a *Yarrowia lipolytica* élesztőfajok fordultak elő, amelyek fénymikroszkópos képét a 15.- 16.- 17. ábra mutatja.



15. ábra: *Debaryomyces hansenii* sarjadzó sejtjei  
(40x-es objektívvel)



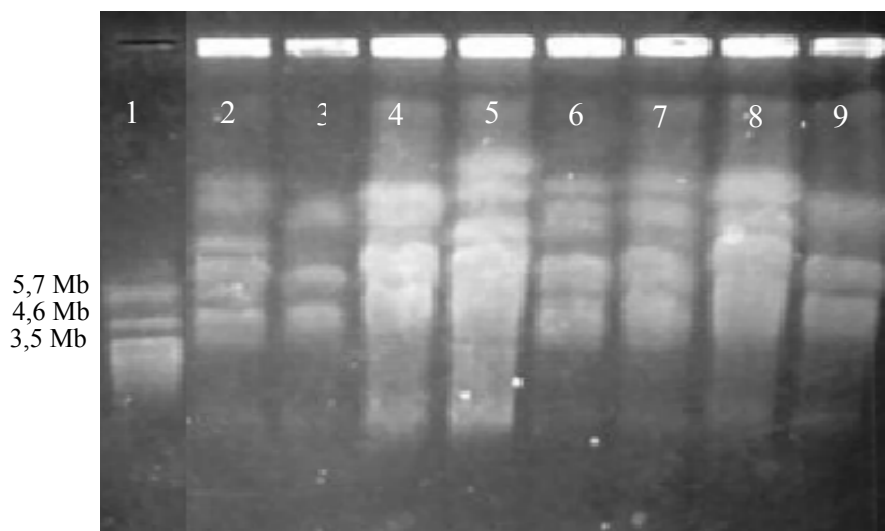
16. ábra: *Yarrowia lipolytica* valódi- és álhifái (40x-es objektív)



17. ábra: *Geotrichum candidum* valódi hifái artrokonídiumokkal  
(40 x objektív)

#### 4.4. A *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek kariotipizálása

A kariotipizálás a molekuláris módszerek közül gyakran használt technika. Vizsgálataim folytatásaként ezt a módszert alkalmaztam az izolátumok között az egyik leggyakoribb, *Geotrichum candidum* élesztőfajhoz tartozó izolátumok összehasonlításához. A vizsgálathoz szükséges, a kromoszómákat tartalmazó agaróz blokkokat a 3.2.8. pont szerint készítettem el, a kromoszómák pulzáló gélelektroforézissel való szétválasztása a 3.2.9. pont szerint történt. A 18. ábrán jól látható - annak ellenére, hogy a kromoszómák szétválasztása nem tökéletes -, hogy a tejtermékekből származó *Geotrichum candidum* élesztőizolátumok szétválasztott kromoszóma száma 3 és 6 között változik. Megfigyelhető, hogy az élesztőtörzsek kariogramjuk alapján megkülönböztethetők egymástól, csupán két törzs, a Tolle túróból izolált tott II/ gc jelű és a Mizzo túróból származó mitt/ gc izolátumok kromoszóma-ujjlenyomata egyforma.



17. ábra: A *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek kariogramjai.

oszlopok: 1.: *Schizosaccharomyces pombe* marker, 2.: nbht V / gc (nagybánhegyesi túró), 3.: ks1 / gc (kecskesajt), 4.: vtt/ gc (veszprémetej túró), 5.: tott I / gc (Tolle túró) 6.: tott II / gc (Tolle túró) 7.: mitt/ gc (Mizzo túró), 8.: nut IV / gc (nádudvari tehéntúró), 9.: nut V/gc (nádudvari tehéntúró)

## **4.5. Hazai tejtermékekből származó élesztőfajok- és törzsek azonosítása és összehasonlítása molekuláris módszerekkel**

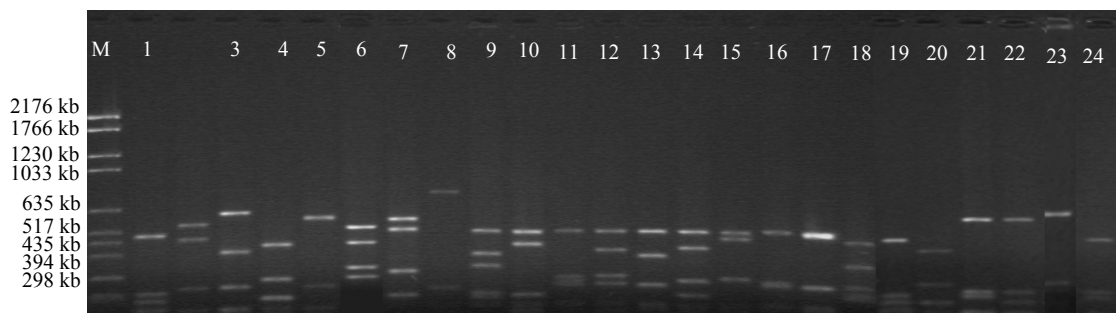
### **4.5.1. A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása ribotipizálással**

A tejtermékekből származó izolátumok molekuláris módszerekkel történő vizsgálatával egy olyan módszer kiválasztása volt a célom, amelynek segítségével a fajok gyorsan és pontosan azonosíthatók. A másik célom az volt, hogy az élesztőizolátumokat molekuláris biológiai módszerrel is identifikáljam, megerősítve ezzel az egyszerűsített identifikációs módszerrel kapott eredményt.

A molekuláris gyors módszerek közül először a ribotipizálást alkalmaztam. A vizsgált élesztőtörzsekből rDNS-eknek 18S és az azzal szomszédos ITS1 szakaszát polimeráz láncreakció segítségével, NS1 és ITS2 primereket használva sokszoroztam meg. Az élesztőfajok elkülönítésére a *Hae III* és az *Msp I* restrikciós enzimeket használtam.

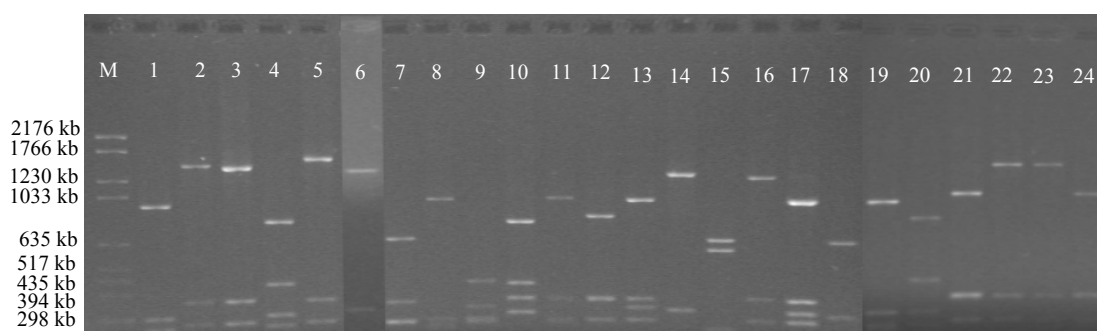
#### **4.5.1.1. A tejtermékekben előforduló élesztőfajok referenciatörzseinek ribotípusai és molekuláris adatbankja**

Az izolátumok azonosításához legelső lépésként az egyszerűsített identifikációs rendszer segítségével kapott eredmények alapján a hazai tejtermékekben előforduló élesztőfajok referenciatörzseinek ribotipizálását végeztem el (19.-20. ábra), majd a kapott eredmények alapján elkészítettem a referenciatörzsek molekuláris adatbankját (21. ábra). Az izolátumok közül a *Bulleromyces albus* és a *Trichosporon inkin* fajúnak meghatározott izolátumokhoz nem sikerült referencia törzset beszerezni, így azok a molekuláris adatbankból hiányoznak.



19. ábra: A tejtermékekben előforduló élesztőfajok referenciatörzseinek *Hae* III restrikciós enzimmel végzett emésztésének restrikciós mintázata

M: marker, a referenciatörzsek sorrendje: 1. *Metschnikowia reukaufii* NCAIM Y1120, 2. *Torulaspora delbrueckii* NCAIM Y982, 3. *Saccharomyces exiguus* NCAIM Y1033<sup>T</sup>, 4. *Pichia membranifaciens* NCAIM Y1044<sup>T</sup>, 5. *Candida glabrata* CBS138, 6. *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y591, 7. *Cryptococcus curvatus* NCAIM Y1210, 8. *Candida lusitaniae* CBS6936, 9. *Rhodotorula mucilaginosa* NCAIM Y212, 10. *Pichia kluyverii* NCAIM Y680, 11. *Candida sake* CBS159, 12. *Candida mesenterica* NCAIM Y1072, 13. *Candida parapsilopsis* CBS604, 14. *Candida catenulata* NCAIM Y1032, 15. *Geotrichum candidum* NCAIM Y274, 16. *Dekkera bruxellensis* NCAIM Y1007<sup>T</sup>, 17. *Candida maltosa* CBS5611, 18. *Cryptococcus laurentii* NCAIM Y1321, 19. *Pichia fermentans* NCAIM Y86<sup>T</sup>, 20. *Candida rugosa* CBS613, 21. *Pichia carsonii* NCAIM Y968<sup>T</sup>, 22. *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y260, 23. *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y1070, 24. *Debaryomyces hansenii* NCAIM Y898

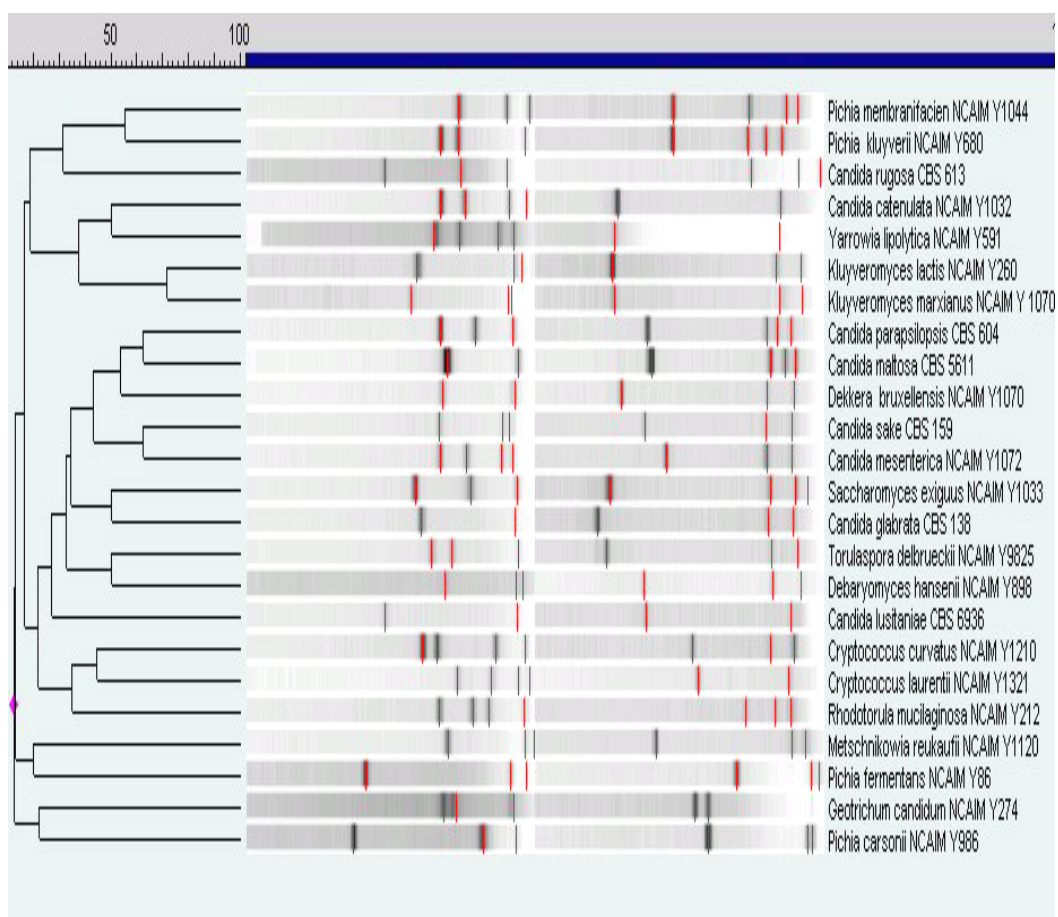


20. ábra: A tejtermékekben előforduló élesztőfajok referenciatörzseinek *Msp* I restrikciós enzimmel végzett emésztésének restrikciós mintázata

M: marker, a referenciatörzsek sorrendje: 1. *Metschnikowia reukaufii* NCAIM Y1120, 2. *Torulaspora delbrueckii* NCAIM Y982, 3. *Saccharomyces exiguus* NCAIM Y1033<sup>T</sup>, 4. *Pichia membranifaciens* NCAIM Y1044<sup>T</sup>, 5. *Candida glabrata* CBS138, 6. *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y591, 7. *Cryptococcus curvatus* NCAIM Y1210, 8. *Candida lusitaniae* CBS6936, 9. *Rhodotorula mucilaginosa* NCAIM Y212, 10. *Pichia kluyverii* NCAIM Y680, 11. *Candida sake* CBS159, 12. *Candida mesenterica* NCAIM Y1072, 13. *Candida parapsilopsis* CBS604, 14. *Candida catenulata* NCAIM Y1032, 15. *Geotrichum candidum* NCAIM Y274, 16. *Dekkera bruxellensis* NCAIM Y1007<sup>T</sup>, 17. *Candida maltosa* CBS5611, 18. *Cryptococcus laurentii* NCAIM Y1321, 19. *Pichia fermentans* NCAIM Y86<sup>T</sup>, 20. *Candida rugosa* CBS613, 21. *Pichia carsonii* NCAIM Y968<sup>T</sup>, 22. *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y260, 23. *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y1070, 24. *Debaryomyces hansenii* NCAIM Y898

A ribotipizálás során valamennyi referenciatörzs esetén értékelhető restrikciós mintázatot kaptam a molekuláris marker mérettartományán belül (298-2176 bp), az ennél kisebb méretű fragmentumokat gyenge festődésük miatt az identifikálásnál nem vettem figyelembe.

A 19-20. ábrákon megfigyelhető, hogy mind a *Hae III*, mind a *Msp I* restrikciós enzim alkalmazása esetén a referenciatörzsek legnagyobb részének eltérő az ujjlenyomata. A *Hae III* enzim alkalmazásakor a *Candida maltosa* és a *Dekkera bruxellensis* ujjlenyomata volt hasonló, az *Msp I* enzim alkalmazásakor viszont az előbbi fajnál 3, az utóbbinál 4 értékelhető fragmentumot kaptam. Az *Msp I* enzimmel történő ribotipizálás a *Candida catenulata* és a *Yarrowia lipolytica*, illetve a *Kluyveromyces lactis* és a *Kluyveromyces marxianus* referencia törzsek esetén eredményezett egyforma mintázatot, de a *Hae III* enzim megkülönböztette egymástól őket.

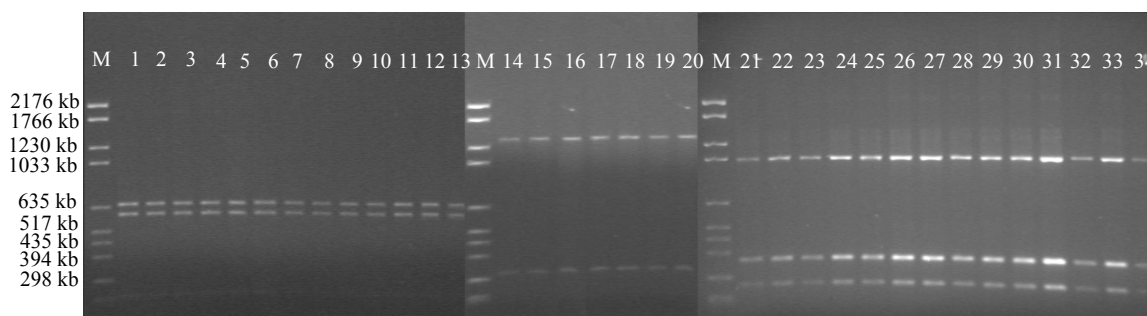


21. ábra: A tejtermékekben előforduló élesztőfajok referenciatörzseinek molekuláris adatbankja

A molekuláris dendogramjuk (21. ábra) alapján a referenciatörzseket három nagyobb csoportba lehet besorolni, amelyek közül az első és a második egymással való hasonlósági szintje 18 %-os, a harmadikkal való hasonlósági szintjük csupán 15 %-os volt. Az első és a harmadik csoport két kisebb részre osztható, a második csoport törzseit pedig több kis csoportba lehetett besorolni, ami a referenciatörzsek jelentős diverzitását mutatja. A legnagyobb hasonlósági szintű (72 %) *Kluyveromyces marxianus* és *Kluyveromyces lactis* referenciatörzsek az első csoportba tartoztak. 100 %-os hasonlóságot egyik törzs sem mutatott egy másik törzsszel, ami azt bizonyítja, hogy az alkalmazott enzimekkel a referenciatörzsek elválaszthatók egymással.

#### 4.5.1.2. A tejtermékekből származó izolátumok ribotipizálása és azonosításuk a molekuláris adatbank segítségével

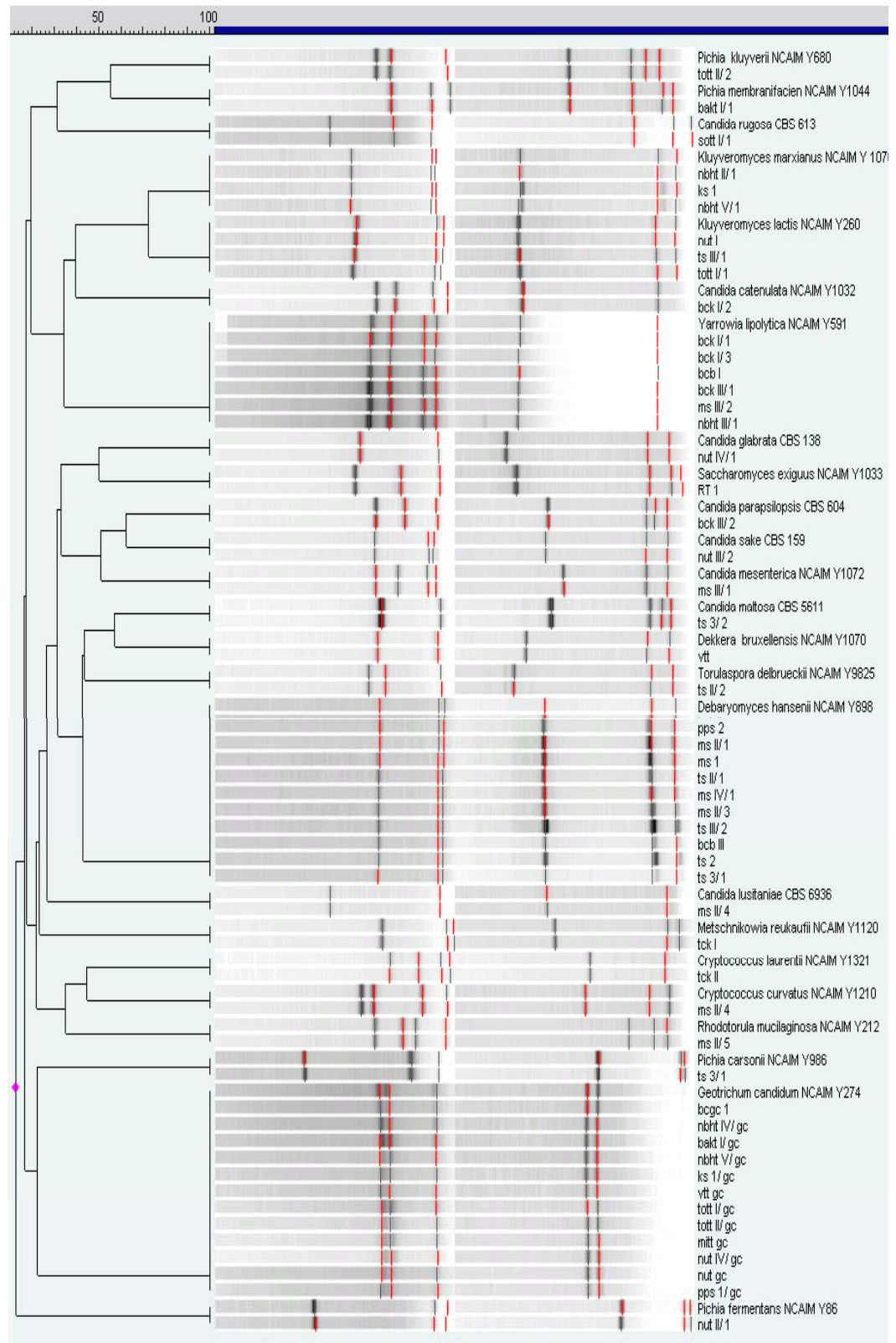
A referenciatörzsek adatbankjának elkészítését követően a hazai tejtermékekből gyűjtött izolátumok ribotipizálását is elvégeztem. A hagyományos módszereken alapuló egyszerűsített identifikációs rendszer segítségével végzett meghatározás során kapott eredmények alapján az azonos fajba tartozó izolátumokat az agaróz gélen egymás mellé helyezve egy fajon belül egyforma mintázatot nyertem, tehát az élesztőizolátumok ribotipizálás segítségével történő genotípusos jellemzése fajspecifikus gélmintázatot adott (22. ábra).



22. ábra: A tejtermékekből származó izolátumok közül a *Geotrichum candidum*, a *Yarrowia lipolytica* és a *Debaryomyces hansenii* fajba tartozók *Msp I* restriktációs enzimmel végzett emésztésének mintázata

M: marker, oszlopok: 1.: Bakony camembert sajtból, 2.: Pálpusztai sajtból, 3., 4.: Tolle tehéntúróból, 5. oszlop: Nádudvari tehéntúróból, 6. oszlop: Bakony tehéntúróból, 7. oszlop: Mizzo tehéntúróból, 8. oszlop: Nádudvari tehéntúróból, 9. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból, 10. oszlop: Kecsesajtból, 11. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból, 12. oszlop: Veszprémtej tehéntúróból származó izolátumok, 13. oszlop: *Geotrichum candidum* NCAIM Y274, 14., 15., 16., 17.: Bakony camembert sajtból, 18. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból, 19. oszlop: Márványsajtból származó izolátumok, 20. oszlop: *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y591, 21., 22. oszlop: Bakony camembert sajtból, 23. oszlop: Ementáli sajtból, 24. oszlop: Márvány sajtból, 25. oszlop: Pálpusztai sajtból, 26., 27. oszlop: Márvány sajtból, 28., 29., 30. oszlop: Trappista sajtból, 31., 32. oszlop: Márvány sajtból, 33. oszlop: Trappista sajtból származó izolátumok, 34. oszlop: *Debaryomyces hansenii* NCAIM Y898

Ezt követően az izolátumokat az ujjlenyomataik alapján beillesztettem az élesztőfajok referenciatörzseinek molekuláris adatbankjába (23. ábra).



23. ábra: A tejtermékekből származó izolátumok identifikálása a molekuláris adatbank segítségével

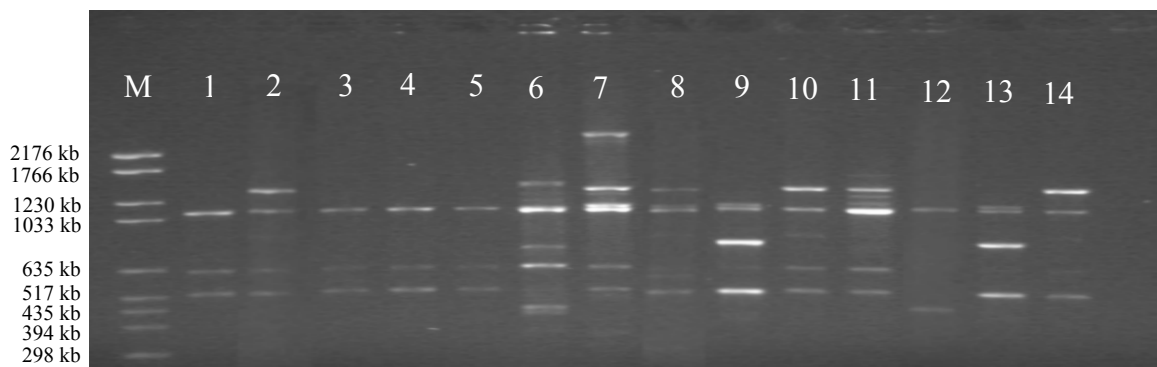
A dendrogram alapján megállapítható, hogy a vizsgált törzsek - a 22. ábrán látható, referenciatörzsekről készült dendrogramhoz hasonlóan - három nagy csoportba voltak oszthatók, amelyektől a *Pichia fermentans* fajúnak azonosított nut II/1 és a NCAIM Y86 jelű referenciatörzs jelentősebb mértékben eltért. Az első csoportba tartozó *Yarrowia lipolytica* referenciatörzzsel 6 izolátum, a második csoportba osztályozott *Debaryomyces hansenii* referenciatörzzsel 13 izolátum, a harmadik csoportba sorolt *Geotrichum candidum* referenciatörzzsel 12 izolátum mutatott 100 %-os hasonlósági szintet. Ezekkel együtt összesen 24, teljes azonosságot mutató clustert figyelhattunk meg, a többi csoportba azonban legtöbb esetben 2-2, illetve a *Kluyveromyces marxianus* és a *Kluyveromyces lactis* referenciatörzseknél 3-3 izolátum tartozott. E két utóbbi cluster egymással való hasonlósági szintje - a referenciatörzsek ribotipizálásának eredményei alapján készült dendrogramhoz hasonlóan - az összes közül a legmagasabb, mintegy 72 %-os volt.

#### **4.5.2. A *Debaryomyces hansenii*, a *Geotrichum candidum* és a *Yarrowia lipolytica* fajokba tartozó izolátumok törzsi szinten történő megkülönböztetése RAPD-PCR és microsatellite-PCR módszerek segítségével**

A leggyakoribb, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii* és *Yarrowia lipolytica* fajokba tartozó élesztőizolátumok további vizsgálata RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) és microsatellite-PCR módszerek segítségével történt.

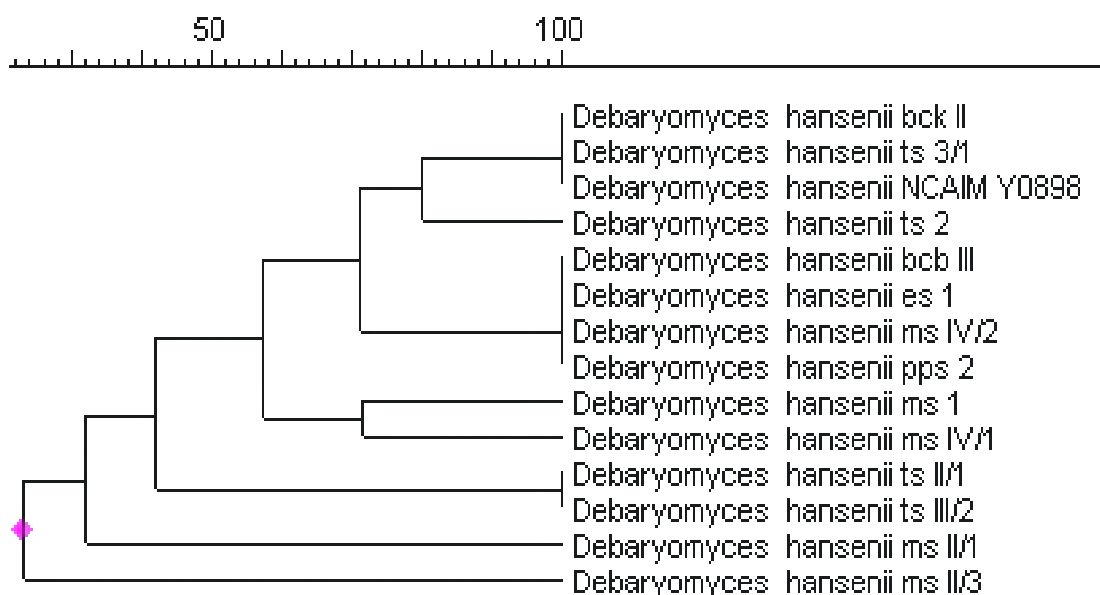
##### **4.5.2.1. A *Debaryomyces hansenii* törzsek elkülönítése**

A *Debaryomyces hansenii* törzsek vizsgálatát először OPE 16 random primer segítségével végeztem el. A 24. ábrán jól látható, hogy a törzsek RAPD analízise nyolcféle mintázatot eredményezett. A kapott fragmentumok száma kettő és nyolc között változott. Az ujjlenyomatok intenzívek és jól megkülönböztethetők voltak.



24. ábra: *Debaryomyces hansenii* élesztőtörzsek megkülönböztetése OPE 16 random primerrel.

M: DNS marker, 1., 2. oszlop: Bakony camembert sajtból (bcb III; bck II), 3. oszlop: Ementáli sajtból (es 1), 4. oszlop: Márvány sajtból (ms IV/2), 5. oszlop: Pálpusztai sajtból (pps 2), 6., 7. oszlop: Márvány sajtból ( ms II/1; ms 1), 8., 9., 10. oszlop: Trappista sajtból (ts 2; ts II/1; ts 3/1), 11., 12. oszlop: Márvány sajtból (ms IV/2; ms II/1), 13. oszlop: Trappista sajtból (ts III/2) származó izolátumok, 14. oszlop: *Debaryomyces hansenii* NCAIM Y0898 referenciatörzs

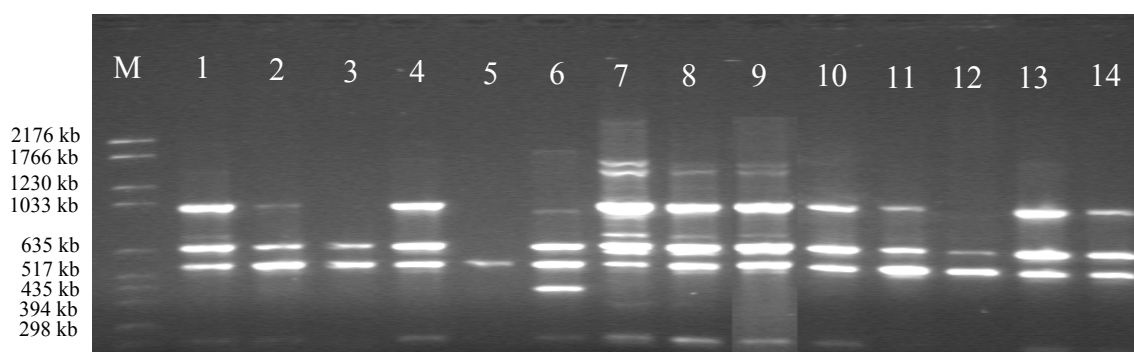


25. ábra: A *Debaryomyces hansenii* élesztőtörzsek dendogramja, amely az OPE 16 random primerrel amplifikált RAPD-PCR eredményei alapján készült

A *Debaryomyces hansenii* élesztőtörzsek OPE 16 primerrel kapott DNS ujjlenyomatai alapján készített dendogramot a 25. ábra mutatja, amely szerint a bck II, a ts 3/1 és a NCAIM Y0898 referencia törzs; a bcb III, az es 1, az ms IV/2, és a pps 2; valamint a ts II/1 és a ts III/2 mutatkozott azonosnak. Az első csoporttal nagyfokú hasonlóságot mutatott a ts 2 izolátum (80 %). 71 %-ban volt egymással hasonló az ms 1 és az ms IV/ 1 törzsek. Ugyanakkora hasonlóságú szintű volt még egymással a bck II, a ts 3/1, NCAIM Y0898, ts 2 által alkotott

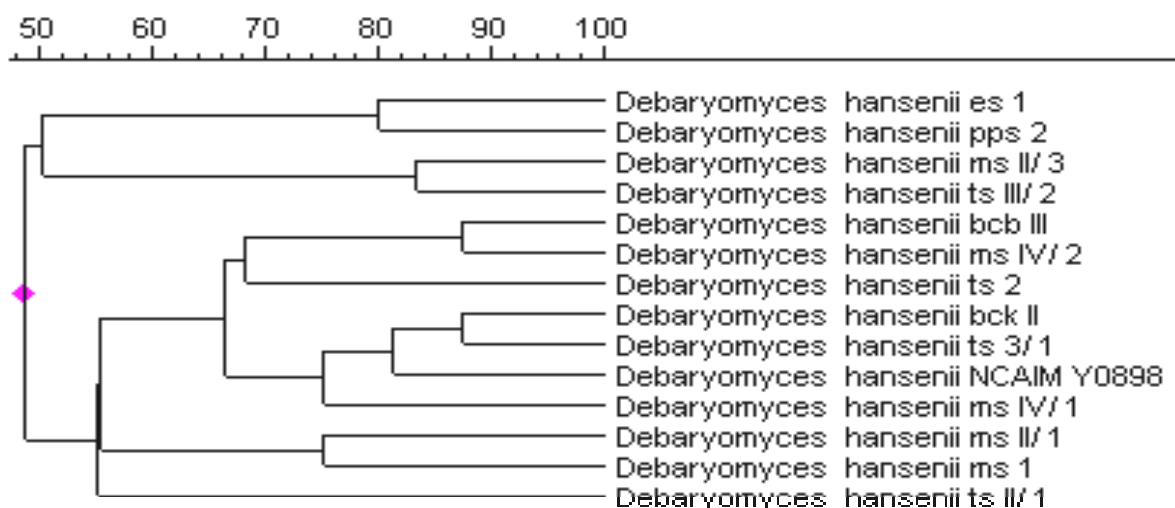
csoport és a bcb III, az es 1, ms IV/ 2, pps 2 törzsekből álló csoport. Ezekhez csupán 42 %-ban volt hasonló a ts II/ 1 és ts III/ 2 izolátumok alkotta csoport. A legkisebb fokú azonosságot az ms II/1 (32 %) és az ms II/3 (23 %) törzsek mutatták a többi törzsszel.

A *Debaryomyces hansenii* izolátumok törzsi szinten történő pontosabb megkülönböztetése érdekében a belőlük izolált DNS-t M13-as microsatellite primerrel is amplifikáltam (26. ábra). A mintázatuk alapján a törzseket 6 csoportba lehetett sorolni, a kapott fragmentumok száma 1 és 8 közötti volt. Az OPE 16 és a M 13 primerekkel elért eredmények összevonásával dendogramot szerkesztettem (27. ábra).



26. ábra: *Debaryomyces hansenii* élesztőtörzsek megkülönböztetése M 13 microsatellite primerrel.

M: DNS marker, 1. oszlop: *Debaryomyces hansenii* NCAIM Y0898 referenciatörzs, 2., 3. oszlop: Bakony camembert sajtból (bcb III; bck II), 4. oszlop: Ementáli sajtból (es 1), 5. oszlop: Pálpusztai sajtból (pps 2), 6., 7. oszlop: Márvány sajtból (ms II/1; ms 1), 8., 9. oszlop: Trappista sajtból (ts II/1, ts 2), 10., 11. oszlop: Márvány sajtból (ms IV/ 1, ms IV/2), 12., 13. oszlop: Trappista sajtból (ts 3/1, ts III/2), 14. oszlop: Márvány sajtból (ms II/3) származó izolátumok.

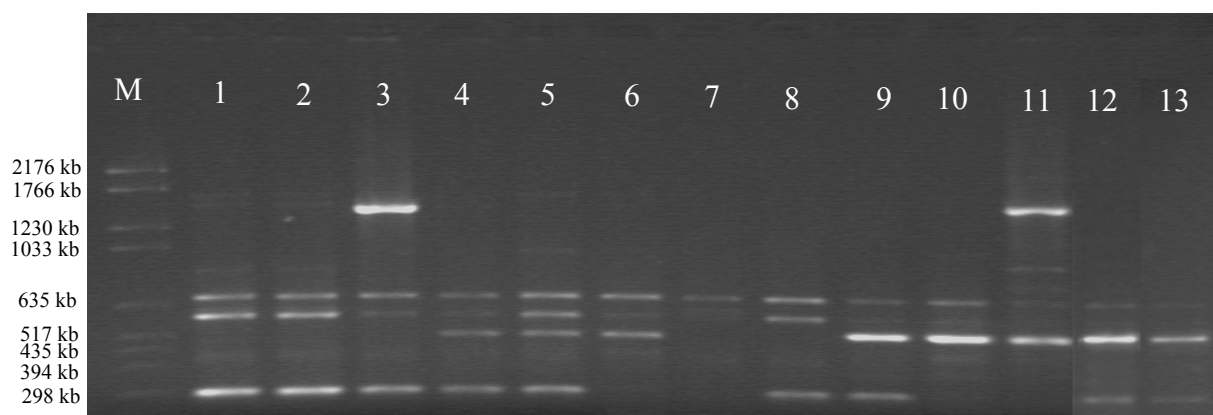


27. ábra.: A *Debaryomyces hansenii* élesztőtörzsek dendogramja, amely az OPE 16 és az M 13 primerekkel, a RAPD-PCR és a microsatellite-PCR módszerekkel kapott eredmények összevonásával készült

A 27. ábra alapján jól látható, hogy a *Debaryomyces hansenii* fajba tartozó izolátumok között nem voltak teljesen azonos törzsek, ellentétben azzal, amit az OPE 16 primerrel kapott dendogram esetén tapasztaltam. Az élesztőtörzseket két fő, egymással csak 49 % hasonlósági szintű csoportba tudtam csoportosítani, amelyek közül az első két kisebb mértékben, másik, az izolátumok többségét magába foglaló cluster négy csoportra volt bontható. A legmagasabb, 88 %-os hasonlósági szint a bcb III és az ms IV/2, illetve a bck II és a ts 3/1 élesztőtörzseknél volt megfigyelhető, amelyek az OPE 16 primerrel készített dendogram alapján teljesen azonosnak tűntek egymással. Az OPE 16 primerrel készült dendogramon a bck II, a ts 3/1 és a NCAIM Y0898 izolátumokból álló csoporttal nagyfokú, mintegy 80 %-os hasonlósági szinten álló ts 2 izolátum ebben az esetben kisebb mértékben, 66 %-ban mutatott hasonlóságot. Az előbbi dendogramon szintén azonosnak mutatott pps 2 és es 1 izolátumok az összevont dendogramon kisebb, de még ez esetben is 80 %-ban hasonlítanak egymáshoz. A *Debaryomyces hansenii* NCAIM Y0898 referencia törzs a bck II és a ts 3/1 jelű izolátumokkal mutatott legnagyobb, megközelítőleg 82 %-os hasonlósági szintet, amely három törzs az OPE 16 primer segítségével kapott dendogramon egyformának mutatkozott. Figyelemre méltó, hogy míg márványsajtból származó ms II/1 és ms 1 izolátumok egymással viszonylag nagyfokú hasonlóságot (75 %) mutatnak, a szintén márványsajtból izolált ms II/3, ms IV/1 és ms IV/2 törzsek ezekkel és egymással való különbsége nagy. Szintén érdekes, hogy a Trappista sajtból izolált ts III/2, ts 2, ts 3/1 és ts II/1 jelű törzsek más-más csoportba kerültek.

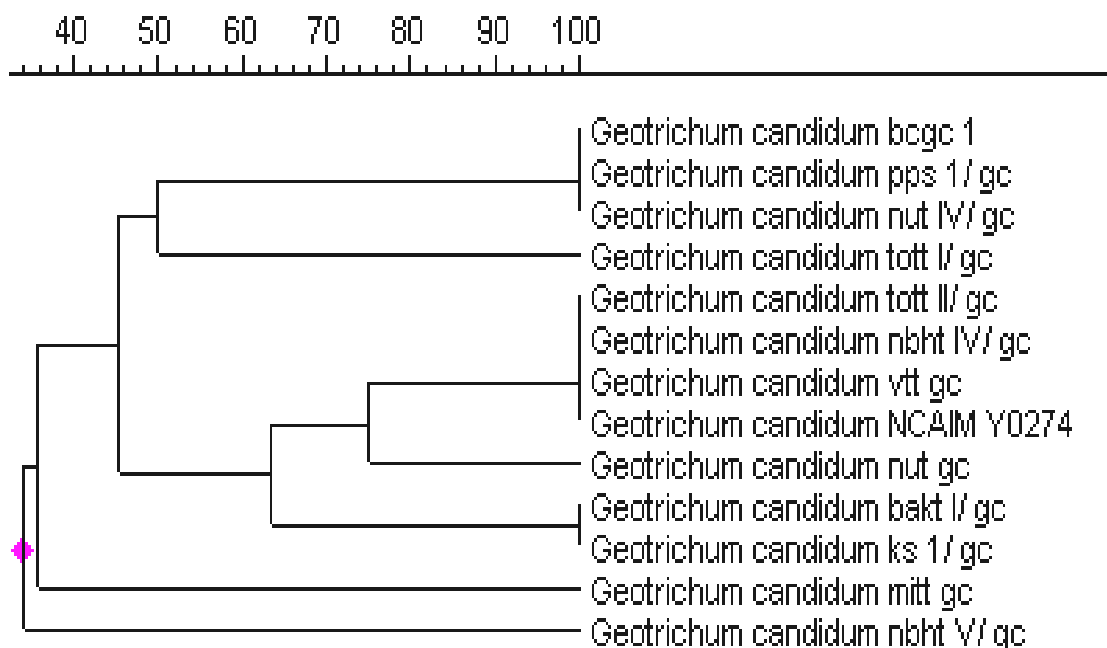
#### **4.5.2.2. *Geotrichum candidum* törzsek összehasonlítása**

A *Debaryomyces hansenii* törzsekhez hasonlóan a *Geotrichum candidum* törzsek RAPD-PCR vizsgálatát is OPE 16 primer segítségével végeztem el (28. ábra). Ebben az esetben 7 féle mintázatot nyertem és a kapott fragmentumok száma viszonylag kicsi (1-4) volt. A törzsek ujjlenyomatai alapján dendogramot szerkesztettem (29. ábra).



28. ábra: *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek megkülönböztetése OPE 16 random primerrel.

M: DNS marker, 1. oszlop: Bakony camembert sajtból (bcgc 1), 2. oszlop: Pálpusztai sajtból (pps 1/gc), 3. 4. oszlop: Tolle tehéntúróból (tott I/gc; tott II/gc), 5. oszlop: Nádudvari tehéntúróból (nut gc), 6. oszlop: Bakony tehéntúróból (bakt I/gc), 7. oszlop: Mizzo tehéntúróból (mitt gc), 8. oszlop: Nádudvari tehéntúróból (nut IV/gc), 9. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból (nbht IV/gc), 10. oszlop: Kecsesajtból (ks 1/gc), 11. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból (nbht V/gc), 12. oszlop: Veszprémetej tehéntúróból származó izolátumok (vtt gc), 13. oszlop: *Geotrichum candidum* NCAIM Y0274

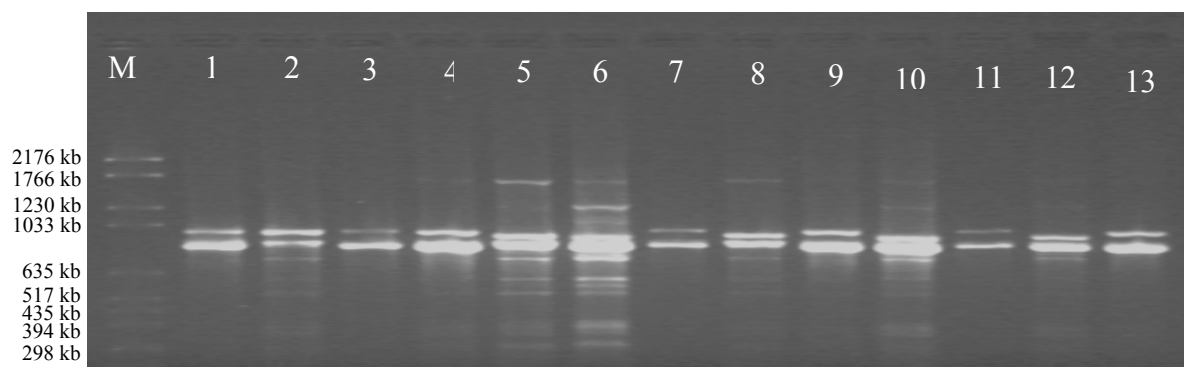


29. ábra: A *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek dendogramja, amely az OPE 16 random primerrel amplifikált RAPD-PCR eredményei alapján készült.

A *Geotrichum candidum* izolátumok többségét az OPE 16 primerrel végzett RAPD-PCR eredményei alapján két fő clusterba lehetett csoportosítani, amelyektől az nbht V/ gc és a

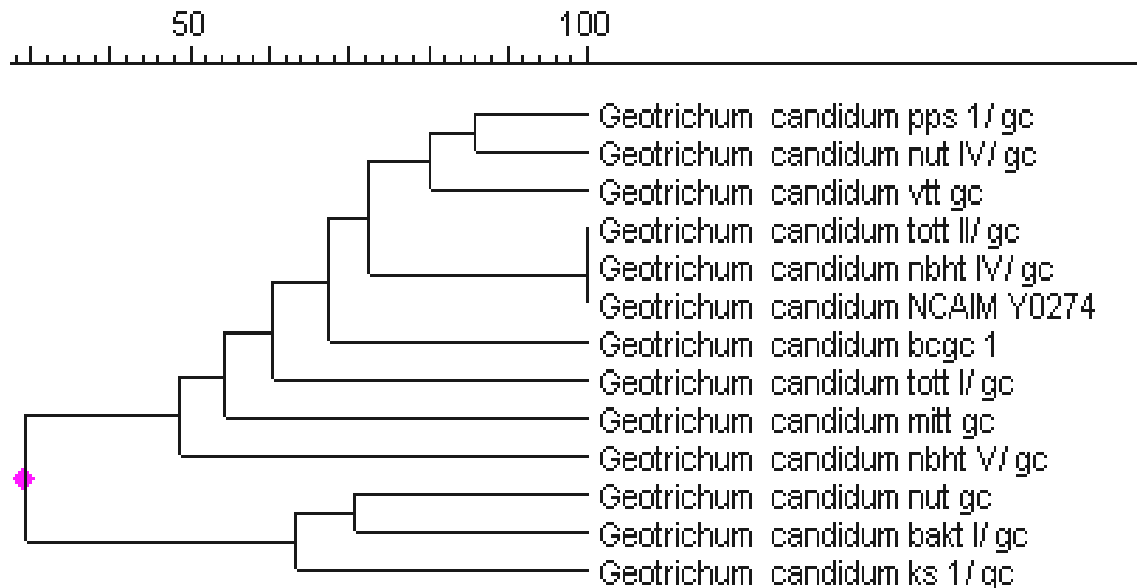
mitt gc izolátumok jelentősen eltértek. Az első clusterba tartozó bcgc 1, pps 1/ gc és a nut IV/ gc a DNS ujjlenyomataik alapján azonosak, velük a Tolle tehéntúróból származó tott I/ gc izolátum 50 %-os hasonlóságot mutat. Érdekes módon a szintén Tolle tehéntúróból izolált tott II/ gc a másik clusterba lett sorolva, amely az előzővel csupán 46 %-os hasonlósági szinten áll. Ebben a csoportban az említett tott II/ gc az nbht IV/ gc, a vtt/ gc és a NCAIM Y0274 jelű törzsek teljesen azonosnak bizonyultak, ezekkel a nut gc jelű törzs pedig 75 %-os hasonlóságot mutatott. Velük az egymással azonos bakt I/ gc és a ks 1 izolátumok 63 %-os hasonlósági szinten állnak. Figyelemre méltó, hogy az ebbe a clusterba tartozó nagybánhegyesi tehéntúróból származó nbht IV/ gc izolátum a szintén innen származó nbht V/ gc jelű törzssel csak 34 %-ban hasonlós.

A *Geotrichum candidum* izolátumok pontosabb megkülönböztetésére törekedve az összehasonlítást szintén elvégeztem M 13 microsatellite primer segítségével is (30. ábra). A kapott fragmentumok száma az OPE 16 primerhez képest már szélesebb határok közt mozgott (2-10), ebben az esetben azonban csak 4 féle mintázatot tudtam megkülönböztetni.



30. ábra: *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek megkülönböztetése M 13 microsatellite primerrel.

M: DNS marker, 1. oszlop: Bakony camembert sajtból (bcgc 1), 2. oszlop: Pálpusztai sajtból (pps 1/gc), 3. 4. oszlop: Tolle tehéntúróból (tott II/gc; tott II/gc), 5. oszlop: Nádudvari tehéntúróból (nut gc), 6. oszlop: Bakony tehéntúróból (bakt I/gc), 7. oszlop: Mizzo tehéntúróból (mitt gc), 8. oszlop: Nádudvari tehéntúróból (nut IV/gc), 9. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból (nbht IV/gc), 10. oszlop: Kecsesajtból (ks 1/gc), 11. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból (nbht V/gc), 12. oszlop: Veszprémetej tehéntúróból (vtt gc) származó izolátumok, 13. oszlop: *Geotrichum candidum* NCAIM Y0274



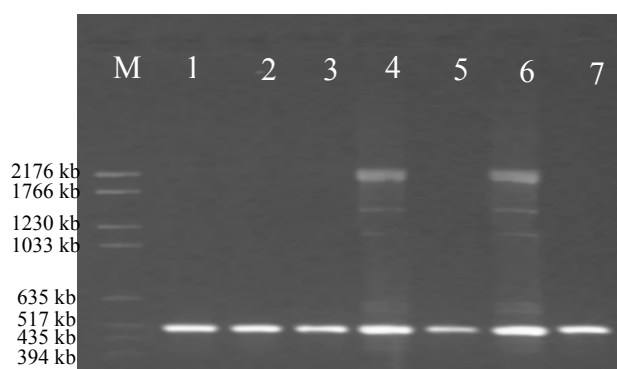
31. ábra: A *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek dendogramja, amely az OPE 16 és az M 13 primerekkel, RAPD-PCR és microsatellite-PCR módszerekkel kapott eredmények összevonásával készült.

A RAPD-PCR és microsatellite-PCR módszerekkel elvégzett, OPE 16 random primerrel, illetve az M 13 microsatellite primerrel amplifikált DNS mintázatok alapján elkészített összevont dendogramon (31. ábra) az izolátumok egy nagyobb és egy kisebb csoportba lettek osztva. A két cluster egymással 30 %-os hasonlósági szinten áll. A nagyobbba tartozó tott II/ gc, nbht IV/ gc és a NCAIM Y0274 referenciatörzs az OPE 16 primerrel végzett RAPD eredményekből készült dendogrammal egyezően ebben az esetben is azonosak, a vtt gc izolátum hasonlósága velük azonban 100 %-ról 72 %-ra csökkent. Úgyszintén csökkenés volt megfigyelhető a pps1/ gc és a nut IV/ gc izolátumok esetén is, 100 %-ról 80 %-ra. A nagyobb clusteren belül az nbht V/ gc és a mitt gc különbözött leginkább a többségtől, amely két törzs az OPE 16 primer esetén a többi izolátumtól legnagyobb mértékben eltér. A másik, kisebb clusterba az OPE 16 primer használatakor kapott dendogramon azonosként szereplő bakt I/ gc és ks 1/ gc, illetve a velük 64 %-ban hasonló nut gc, csak a hasonlósági szintjük változott meg. A bakt I/ gc jelű izolátum hasonlósága a ks 1 jelű izolátummal 64 %-ra csökkent, a nut gc jelű törzsszel pedig 70 %-ra nőtt. Érdekes módon a nádudvari tehéntúróból származó nut gc és a nut IV/ gc jelű izolátumok más clusterbe kerültek és hasonlóságuk csak 30 %-os. Az nbht IV/ gc, az nbht V/ gc, a tott I/ gc és a tott II/ gc jelű izolátumok ugyan mindannyian a nagyobb clusterbe kerültek, de a

nagybánhegyesi tejgyárban gyártott nbht IV/ gc és nbht V/ gc törzsek csupán 49 %-ban, a Tolle tehéntúróból izolált tott I/ gc és a tott II/ gc 60 %-ban hasonlók. Az említett tott II/ gc és nbht IV/ gc jelű izolátumok viszont teljesen azonosak egymással és a NCAIM Y0274 referencia törzsszel.

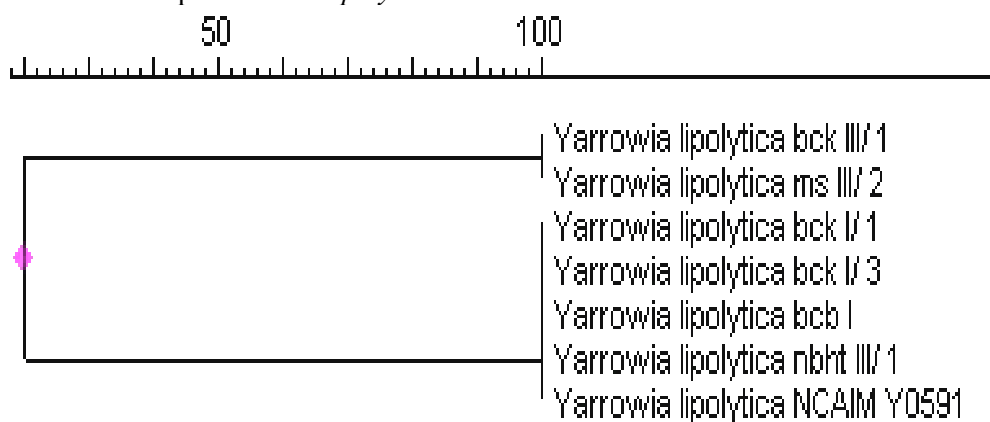
#### 4.5.2.3. A *Yarrowia lipolytica* törzsek vizsgálata

Az előző két fajjal azonos módon a *Yarrowia lipolytica* törzsek vizsgálatát is először az OPE 16 primerrel végeztem el (32. ábra). A három leggyakrabban előforduló faj közül ebben az esetben volt a legkisebb az ujjlenyomatok változatossága, mindössze kétféle mintázatot lehetett megkülönböztetni. A kapott fragmentumok száma 1 és 4 volt.



32. ábra: *Yarrowia lipolytica* élesztőtörzsek megkülönböztetése OPE 16 random primerrel.

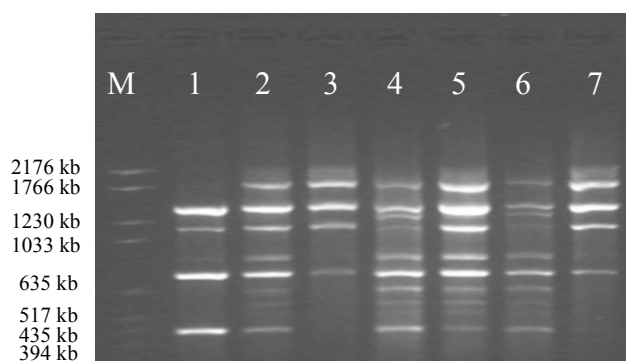
M: DNS marker, 1., 2., 3., 4. oszlop: Bakony camembert sajtból (bck I/1; bck I/3; bcb I; bck III/1), 5. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból (nbht III/1), 6. oszlop: Márványsajtból (ms III/1) származó izolátumok. 7. oszlop: *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y591



33. ábra: A *Yarrowia lipolytica* élesztőtörzsek dendrogramja, amely az OPE 16 random primerrel amplifikált RAPD-PCR eredményei alapján készült.

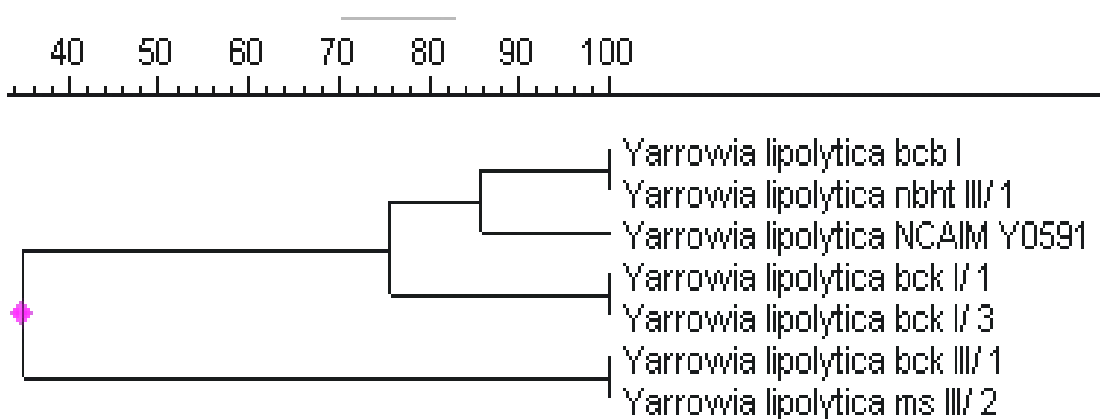
A *Yarrowia lipolytica* élesztőtörzsek OPE 16 primerrel végzett RAPD analízisével kapott eredményekből szerkesztett dendogram (32. ábra) alapján az izolátumok két fő csoportba oszthatók (bck III/1 és a ms III/2, illetve a bck I/1, bck I/3, bcb I, nbht III/1 és a *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y0591<sup>T</sup> típustörzs), amelyek csupán 20 %-os hasonlósági szinten állnak egymással és az izolátumok egyes csoporton belül azonosak egymással.

A *Yarrowia lipolytica* törzsek M 13 primerrel történő microsatellite-PCR analízise (34. ábra) eredménye szerint a törzsek ujjlenyomatainak változatossága (5 féle mintázat) és a kapott fragmentumok száma (4-8) az OPE 16 primerhez képest jelentősen megnövekedett.



34. ábra: *Yarrowia lipolytica* élesztőtörzsek megkülönböztetése M 13 microsatellite primerrel.

M: DNS marker, 1., 2., 3., 4. oszlop: Bakony camembert sajtból (bck I/1; bck I/3; bcb I; bck III/1), 5. oszlop: Nagybánhegyesi tehéntúróból (nbht III/1), 6. oszlop: Márványsajtból (ms III/2) származó izolátumok



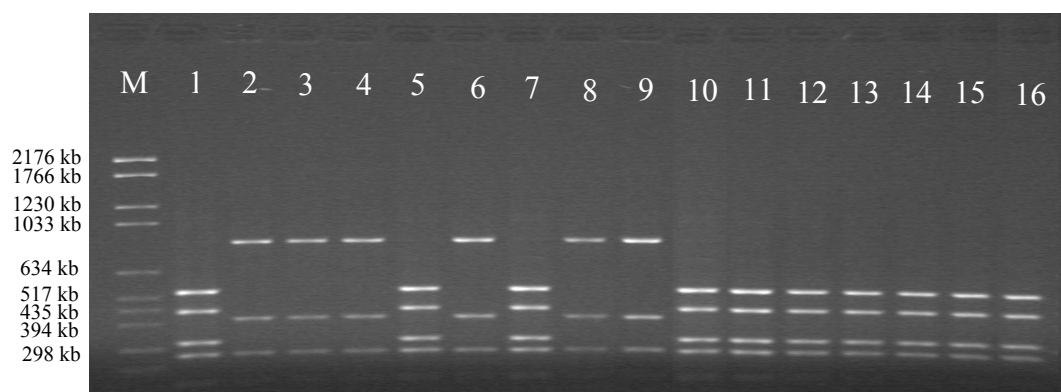
35. ábra: A *Yarrowia lipolytica* élesztőtörzsek dendogramja, amely az OPE 16 és az M 13 primerekkel, RAPD-PCR és microsatellite-PCR módszerekkel kapott eredmények összevonásával készült.

A *Yarrowia lipolytica* törzsek OPE 16 és M 13 primerrel történő RAPD-PCR, illetve microsatellite-PCR analízise során kapott eredmények alapján készített dendogramot a 35. ábra mutatja. Ebben az esetben az OPE 16 primerrel végzett RAPD analízis eredményeiből készült dendogramon az 5, azonos izolátumból álló csoport kisebb csoportokra bomlott. Az egymással azonos bcb I és nbht III/ 1 izolátumokból álló csoport a NCAIM Y0591 referencia törzzsel 86 %-ban hasonló, ez a három izolátum pedig az egymással szintén azonos bck I/ 1 és bck I/ 3 izolátumok által alkotott csoporttal 74 %-os hasonlósági szinten áll. Az egymással azonos bck III/ 1 és ms III/2 jelű izolátumok másik clusterbe kerültek. A két csoport hasonlósági szintje 35 %-ra növekedett az OPE 16 primerrel készült dendogramhoz képest. Érdekes módon a Bakony camembert sajtból származó bck I/ 1 és bck I/3 azonosak egymással, a bcb I-el pedig magas fokú a hasonlóságuk, viszont a szintén ebből a tejterméktípusból izolált bck III/ 1 törzs a másik, az előzőekkel igen alacsony hasonlósági szinten álló clusterbe tartozik. A bcb I izolátum viszont egy másik tejüzemben, a nagybányai tejgyárban gyártott tehéntúróból származó törzzsel, az nbht III/ 1-el azonos. Hasonlóképpen a bck III/ 1 törzs a márványsajtól izolált ms III/ 2 törzzsel azonos.

#### **4.6. A tejtermékekből származó *Yarrowia lipolytica* izolátumok összehasonlítása baromfihúsból származó izolátumokkal**

A tejtermékekben legtöbbször előforduló három élesztőfaj közül a *Yarrowia lipolytica*-ként azonosított izolátumokat (bck I/ 1, bck I/ 3, bcb I, bck III/ 1, nbht III/ 1 és ms III/ 2 jelű izolátumok) más élelmiszertípusból származó izolátumokkal hasonlítottam össze először a molekuláris módszerek közül ribotipizálás segítségével. Ez a kilenc, *Yarrowia lipolytica*-val egyforma telepet képző izolátum (1481-1489 jelű izolátumok) csirkemellből és csirkemájából származott, mivel a hús a tejtermékek mellett a másik élelmiszertípus, amelyben a *Yarrowia lipolytica* gyakran előfordul.

A 18S rDNS NS1 és ITS 2 primerekkel nyert PCR-fragmentek *Hae III* enzim hasításával kapott ujjlenyomatokat összehasonlítva hat élesztőtörzs egymással azonos, de a *Yarrowia lipolytica* típustörzsétől nagymértékben eltérő ujjlenyomatot adott (36. ábra).



36. ábra: A vizsgált izolátumok és a *Yarrowia lipolytica* élesztőfaj PCR-ral nyert amplikátumának *Hae III* restrikciós endonukleázzal való hasításával kapott ujjlenyomatai

M: marker, oszlopok: 1.: 1481. 2.: 1482, 3.: 1483, 4. : 1484, 5. : 1485, 6.: 1486, 7.: 1487 8.: 1488, 9.: 1489 számú, csirkehúsból származó izolátumok, 10.: *Yarrowia lipolytica* típus törzs (CBS 6124), 11.-14.: Bakony camembert sajtból, 15.: Nagybánhegyesi tehéntúróból, 16.: Márványsajtól származó izolátumok

Ellentétben a *Hae III* restrikciós endonukleázzal, *Alu I*, a *Hinf I*, az *Msp I*, a *Not I* és az *Sfi I* restrikciós endonukleázok alkalmazása esetén a hasítási fragmentek mérete megegyezett (25. táblázat).

25. táblázat: A tejtermékekből és a csirkehúsból származó izolátumok hasítási fragmentumainak méretei

| Restrikciós endonukleázok | Hasítási fragmentumok (bp)                         |                                                                                                                                            |
|---------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                           | 1482, 1483, 1484, 1486, 1488, 1489 jelű izolátumok | 1481, 1485, 1487, bckI/1, bck I/3, bcb I, bck III/1, nbht III/1, ms III/2 jelű izolátumok, <i>Yarrowia lipolytica</i> CBS 6124 típus törzs |
| <i>Alu I</i>              | 525                                                | 525                                                                                                                                        |
| <i>Hae III</i>            | 830, 415, 250                                      | 535, 435, 410, 250                                                                                                                         |
| <i>Hinf I</i>             | 735                                                | 735                                                                                                                                        |
| <i>Msp I</i>              | 1380, 320                                          | 1380, 320                                                                                                                                  |
| <i>Not I</i>              | 1780                                               | 1780                                                                                                                                       |
| <i>Sfi I</i>              | 1766                                               | 1766                                                                                                                                       |

#### 4.6.1. *Yarrowia lipolytica*-tól eltérő izolátumok jellemzése

A hagyományos módon történő identifikálás során azonban kilenc izolátum közül hat eltérő esetben a tesztek eredménye is eltért a *Yarrowia lipolytica* által adott eredményektől, amelyeket a 26. táblázat mutat be (Péter et al, 2004).

26. táblázat: Hat, csirkehúsból származó izolátum és a *Yarrowia lipolytica* (CBS 6124) típustörzs jellemzői

| Szénforrás hasznosítás      | 1482, 1483, 1484,<br>1486, 1488, 1489 jelű<br>izolátumok | <i>Yarrowia lipolytica</i><br>(CBS 6124) |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| D-galaktóz                  | lassú /gyenge, lassú                                     | változó                                  |
| L-szorbóz                   | változó                                                  | változó                                  |
| D-glükózamin                | -                                                        | -                                        |
| N-acetil-D-glükózamin       | -                                                        | +                                        |
| D-ribóz                     | -/ latens                                                | változó                                  |
| D-xilóz                     | -                                                        | -                                        |
| L-arabinóz                  | -                                                        | -                                        |
| D-arabinóz                  | -                                                        | -                                        |
| L-ramnóz                    | -                                                        | -                                        |
| szaharóz                    | -                                                        | -                                        |
| maltóz                      | -                                                        | -                                        |
| $\alpha,\alpha$ -trehalóz   | változó                                                  | -                                        |
| metil- $\alpha$ -D-glükozid | -                                                        | -                                        |
| cellobióz                   | -                                                        | gyenge/ -                                |
| szalicin                    | -/ gyenge                                                | -/ gyenge                                |
| arbutin                     | -/ gyenge, lassú                                         | -/ lassú                                 |
| melibióz                    | -                                                        | -                                        |
| laktóz                      | -                                                        | -                                        |
| raffinóz                    | -                                                        | -                                        |
| melecitóz                   | -                                                        | -                                        |
| inulin                      | -                                                        | -                                        |
| keményítő                   | -                                                        | -                                        |

|                           | <b>1482, 1483, 1484,<br/>1486, 1488, 1489<br/>jelű izolátumok</b> | <b><i>Yarrowia lipolytica</i><br/>(CBS 6124)</b> |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| glicerol                  | +                                                                 | +                                                |
| mezo-eritritol            | +                                                                 | +                                                |
| ribitol                   | változó                                                           | változó                                          |
| xilitol                   | -/ gyenge, lassú                                                  | -/ gyenge, lassú                                 |
| L-arabinitol              | -                                                                 | -                                                |
| D-glucitol                | +/- lassú                                                         | +                                                |
| D-mannitol                | +/- latens                                                        | +                                                |
| galactitol                | -                                                                 | -                                                |
| mio-inozitol              | -                                                                 | -                                                |
| glukono- $\delta$ -lakton | +/- lassú/ latens                                                 |                                                  |
| 2-keto-D-glükonát         | -                                                                 | -                                                |
| D-glükonát                | +/- lassú/ latens                                                 | változó                                          |
| D-glükuronát              | -                                                                 | -                                                |
| D-galakturonát            | -                                                                 |                                                  |
| DL-laktát                 | +                                                                 | +                                                |
| szukcinát                 | +                                                                 | +                                                |
| citrát                    | +                                                                 | +                                                |
| metanol                   | -                                                                 | -                                                |
| etanol                    | +                                                                 | +                                                |
| propán 1,2 diol           | +/- lassú                                                         | változó                                          |
| bután 2,3 diol            | -/ lassú/ gyenge, lassú                                           | -                                                |
| hexadekán                 | +                                                                 | +                                                |

| <b>Nitrogénforrás hasznosítás</b> | <b>1482, 1483, 1484, 1486, 1488, 1489<br/>jelű izolátumok</b> | <b><i>Yarrowia lipolytica</i><br/>(CBS 6124)</b> |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| kálium-nitrát                     | -                                                             | -                                                |
| nátrium-nitrit                    | -                                                             | változó                                          |
| etilamin-hidroklorid              | +                                                             | változó                                          |
| L-lizin                           | +                                                             | +                                                |
| kreatin                           | +                                                             | változó                                          |
| kadaverin-hidroklorid             | -                                                             | -                                                |
| kreatinin                         | -                                                             | -                                                |
| glükózamin                        | -                                                             | -                                                |
| imidazol                          | -                                                             | -                                                |

|                                                                                  | <b>1482, 1483, 1484, 1486, 1488, 1489<br/>jelű izolátumok</b> | <b><i>Yarrowia lipolytica</i><br/>(CBS 6124)</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| vitaminmentes táptalajon való növekedés                                          | +                                                             | -                                                |
| különböző hőmérsékleten való növekedés                                           |                                                               |                                                  |
| 30 °C                                                                            | +                                                             | +                                                |
| 35 °C                                                                            | -                                                             | változó                                          |
| 50 % (w/w) glükóz élesztőkivonat agaron való növekedés                           | -                                                             | változó                                          |
| 10 % NaCl-t és 5 % glükózt tartalmazó élesztő nitrogén alapagaron való növekedés | +                                                             | változó                                          |
| 16 % NaCl-t és 5 % glükózt tartalmazó élesztő nitrogén alapagaron való növekedés | -                                                             | -                                                |
| 0,1 % cikloheximiddel való növekedés                                             | +                                                             | +                                                |
| 1 % ecetsavval való növekedés                                                    | -                                                             | -                                                |
| keményítő képzése                                                                | -                                                             | -                                                |
| savtermelés kalcium-karbonátos táptalajon                                        | +/- gyenge                                                    | -                                                |
| urea hidrolízis                                                                  | -                                                             | változó                                          |
| Diazonium Blue B reakció                                                         | -                                                             | -                                                |
| zsír bontás                                                                      | +                                                             | +                                                |
| zselatin cseppfolyósítás                                                         | +                                                             | +                                                |

#### 4.6.2. Új élesztőfaj, a *Candida galli* kimutatása

Az említett hat élesztőtörzs és a *Yarrowia lipolytica* közti genetikai különbséget a NCAIM Y.01482, a NCAIM Y.01486, a NCAIM Y.01489 törzsek és a *Yarrowia lipolytica* típustörzs 26S rDNS - ének D1/D2 doménje szekvenálásával erősítettük meg. A szekvenálás eredménye azt mutatta, hogy a NCAIM Y.01482 törzs 42 egymás melletti nukleotidban különbözik az 500 bázispár hosszúságú fragmentben a *Yarrowia lipolytica* típustörzstől, amely a hozzá legközelebbi rokonságban lévő az aszkomiceta élesztők közül. A NCAIM Y.01482 és a másik két törzs (NCAIM Y.01486, NCAIM Y.01489) között csak egy nukleotid különbség van és az RFLP mintázatuk azonos egymással, de a *Yarrowia lipolytica* típustörzsétől különböző. A Y.01482 és a Y.1486 26S rDNS-ének D1/D2 régiója szekvenciája a GenBank adatbázisban lett elhelyezve (GenBank leltári számaik a 27. táblázatban látható).

27. táblázat: A csirkemájból és mellből származó izolátumok vizsgálatához felhasznált törzsek

| Fajok                      | NCAIM <sup>1</sup> gyűjteményi szám | Forrás                  | GenBank gyűjteményi szám |
|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <i>Candida galli</i>       | Y 01482 <sup>1</sup> (CBS 9722)     | csirkemáj, Griffin, GA  | AY116080                 |
| <i>Candida galli</i>       | Y 01483                             | csirkemáj, Griffin, GA  |                          |
| <i>Candida galli</i>       | Y 01484                             | csirkemáj, Griffin, GA  |                          |
| <i>Candida galli</i>       | Y 01486 (CBS 9723)                  | csirkemell, Griffin, GA | AY346454                 |
| <i>Candida galli</i>       | Y 01488                             | csirkemell, Griffin, GA |                          |
| <i>Candida galli</i>       | Y 01489                             | csirkemell, Griffin, GA |                          |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | Y 00591 (CBS 6124)                  | kukorica növény         | U40080 <sup>2</sup>      |

T: típustörzs,

1: National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism, Budapest

2: Kurtzman és Robnett (1998) által leírt szekvencia

Az élettani és biokémiai jellemzők, valamint a molekuláris vizsgálati eredmények alapján a 1482, 1483, 1484, 1486, 1488 és a 1489 jelű izolátumokat *Candida galli* néven írtuk le (Péter et al, 2004).

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK

### 5.1. Táptalajok összehasonlítása élesztők tejtermékekből történő izolálására való alkalmasságuk szempontjából

A 11 féle, élesztők izolálására, számlálására való alkalmasságuk szempontjából összehasonlított szelektív táptalajok élesztőtelep száma között általában csekély a különbség, néhány esetben tapasztaltunk csupán statisztikailag szignifikáns különbséget.

A táptalajok közül a penésztelepek növekedésének gátlása szempontjából a legeredményesebb a MEP volt, amely esetében a bifenil az a hatóanyag, amely teljesen gátolni tudta a penészek kifejlődését. Más részről pedig a MOL, a MEOX, a MOPR nem gátolta megfelelőképpen a penészek elterjedését, így az élesztőtelepeket benőve megnehezítették azok számlálását. A táptalajok baktériumgátló hatását vizsgálva az epesó és az eugenol hatástalannak bizonyult. Szemben korábbi irodalmi adatokkal (Moleyar és Narashimham, 1992, Kim és munkatársai, 1995, Vazquez és munkatársai, 2001), az eugenol, a fokhagyma fő komponense nem gátolta a baktériumokat  $200 \mu\text{gml}^{-1}$  koncentrációban, így a YEE táptalaj jórészt baktériumokkal fedett volt. A táptalajok nyálkássá váltak a baktériumoktól és néhány esetben nem voltak kiértékelhetők emiatt, vagy a számlálást nehezítette a baktériumok és a élesztőtelepek keveredése. Eliskases-Lechner és Prillinger (1996) élesztőkivonat-glükóz-kloramfenikol agart használt  $100 \mu\text{gml}^{-1}$  oligomicinnel kiegészítve, amelyen ugyan tudtak nőni a penészek, így a *Penicillium roquefortii* is, de a penésztelepek átmérőjét nagymértékben csökkentette. Az én vizsgálataim szerint a YGCO agar azonban ugyanolyan koncentrációjú oligomicinnel kiegészítve a baktériumokat gátolta ugyan, de a penészek tudtak rajta növekedni. Rale és Vakil (1984) a molibdát agart kalcium-propionáttal és enélkül is nagymértékben használhatónak találta élesztők gyümölcsfélékből való izolálására.

Egyetértve az irodalmi adatokkal, az RBC, a DRBC, a OGGY, a MEP és a DG18 táptalajok az élesztőtelepek fejlődését megfelelőképpen elősegítette, a penészek és a baktériumok fejlődését pedig gátolta. A nagyméretű telepek nagymértékben könnyebbé tették a telepek számlálását.

A kapott eredményekből következtetve nem minden vizsgált táptalaj ajánlható élesztők izolálására és számlálására roquefort sajtból. Közülük a MES, a MEOX, a MOL, a MOPR, a YEE, a YGCO nem gátolták megfelelőképpen a baktériumok és a penészek növekedését, vagy az élesztők növekedését gátolták.

A megfelelőnek ítélt táptalajok (MEP, OGGY, DG18, RBC, DRBC) mindegyike egyformán hatékonyan alkalmazható az élesztők tejtermékekből történő izolálásához, a kereskedelmi forgalomban kapható DRBC és RBC táptalajokat csupán könnyebb elkészíthetőségükért, és azért a képességükért, hogy színbeli különbséget tesznek a telepek között, emeli ki közülük az élesztők számlálásához és izolálásához a tejtermékekből.

## 5.2. Az izolátumok azonosítása hagyományos módon

A tejtermékekből származó élesztőizolátumok nagyon változatosak voltak. A különböző tejtermékféléből gyűjtött 64 izolátum, amelyeket az egyszerűsített identifikációs rendszer segítségével azonosítottam, 27 fajba volt sorolható. A legtöbbször előforduló izolátumok a tejtermékekben leggyakrabban megtalálható, fehérje- vagy zsírbontó tulajdonsággal rendelkező élesztőfajok közé tartoznak. A *Debaryomyces hansenii* 22,6 %-al, a *Geotrichum candidum* 16,1 %-al, a *Yarrowia lipolytica* 9,7 %-al képviselte magát az azonosított 64 izolátum között. A szintén fehérje- vagy zsírbontó tulajdonságú *Kluyveromyces marxianus*-ként azonosított izolátumok csak kisebb számban, *Trichosporon moniliforme* élesztőfajba tartozó izolátumok pedig egyáltalán nem voltak a vizsgált tejtermékekben. A *Debaryomyces hansenii*, a *Geotrichum candidum* és a *Yarrowia lipolytica* által vezetett sorban a negyedik és az ötödik helyen a *Kluyveromyces lactis* (4,8 %) és a *Candida catenulata* (4,8 %) állt.

Eredményeimhez hasonlóan ezek az élesztőfajok fordultak elő többek között számos más kutató vizsgálataiban során. Roostita és Fleet (1996) Camembert és Roquefort sajtok élesztő biodiverzitását mérték fel. Az azonosított 240 izolátumból a *Debaryomyces hansenii*, a *Candida lipolytica*, a *Candida kefyr*, a *Candida intermedica*, a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Cryptococcus albidus* és a *Kluyveromyces marxianus* fajokat találták a leggyakoribbnak. Tempel és Jacobsen (1998) nyers tej és a Danablu sajt élesztőflórájának összetételét tanulmányozták és az élesztőfajok széles skáláját találták a sajt érése során, köztük a *Candida famata* (teleomorf: *Debaryomyces hansenii*) volt a leggyakoribb, amelyet a *Candida catenulata* követett. Prillinger és munkatársai (1999) 76 izolátumot gyűjtöttek Ausztriából, Dániából, Franciaországból, Németországból és Olaszországból származó sajtokból, amelyeket 39 fajba tudtak sorolni. Vizsgálataik során a *Debaryomyces hansenii*, a *Geotrichum candidum*, az *Issatchenkia orientalis*, a *Kluyveromyces lactis*, a *Kluyveromyces marxianus*, a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Yarrowia lipolytica* és a *Candida catenulata* élesztőfajokat találták a leggyakoribbnak. Andrighetto és munkatársai (2000) Olaszországból származó, tehén-, bivaly- és kecsketejből készített sajtból izoláltak 48 élesztőtörzset. Közülük 42

izolátumot a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Kluyveromyces marxianus*, a *Kluyveromyces lactis*, a *Debaryomyces hansenii*, a *Yarrowia lipolytica* és a *Torulaspora delbrueckii* fajba tudtak sorolni.

Ezeket az eredményeket figyelembe véve az a következtetés vonható le, hogy az általam izolált élesztőfajok, amelyek leggyakrabban fordultak elő különböző, Magyarországon gyártott tejtermékekben, hasonlóak az európai országokban vizsgált tejtermékekben levő élesztőfajokhoz. A magyarországi izolátumok közül a *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida intermedia*, *Cryptococcus albidus* és az *Issatchenkia orientalis* fajok hiányoztak.

### **5.3. *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek kariotipizálása**

A kariotipizálás során azt vizsgáltam, hogy - mivel az egyes élesztőtörzseknek a kromoszómaszáma és nagysága különbözhet egymástól - ez a módszer alkalmas-e az egyik, tejtermékekben leggyakrabban előforduló élesztőfaj törzsei közötti polimorfizmus kimutatására. A *Geotrichum candidum* törzsek kariotípusának meghatározása során - annak ellenére, hogy a kapott kariogramok kromoszóma sávjai nem voltak elég élesek - kromoszóma polimorfizmus volt észrevehető egyes törzsek között, két izolátum bizonyult csupán izogenikusnak.

A legnagyobb genetikai állománnyal rendelkező *Saccharomyces cerevisiae* törzseket legtöbb esetben kariotipizálással jól szét lehet választani, mivel a kromoszómamérete 230 és 2352 Kbp között változik (Deák, 2003). A jóval nagyobb - 0,6-4,5 Mb - kromoszómaméretű *Geotrichum candidum* (Gente et al, 2002) esetén ez a módszer kevésbé bizonyult alkalmasnak a törzsek gyors tipizálására. Ennek az egyik oka az, hogy a kromoszómák szétválasztása nem volt tökéletes, mivel a *Geotrichum candidum* törzsek kromoszómáinak elég kicsi a mozgékonyasága, aminek a nagy méretük és kis méretbeli különbségük az oka. Ezenkívül a törzsek kariotípus szerinti megkülönböztetésénél sokszor nehézséget jelentett a módszer lassúsága, idő- és munkaigénye.

#### 5.4. A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása ribotipizálás segítségével

A ribotipizálás során kapott eredmények szerint a polimeráz láncreakció segítségével megsokszorozott 18S rDNS és a vele szomszédos ITS1 régió *Hae III* és *Msp I* restrikciós enzimekkel hasítása az élesztőizolátumok faji szinten történő azonosítására alkalmas módszernek bizonyult. Valamennyi referenciatörzs esetén jól értékelhető restrikciós mintázatot kaptam és a *Hae III*, valamint az *Msp I* enzimekkel kapott mintázatok összevonásával olyan molekuláris adatbankot sikerült létrehozni, amelyben az egyes referenciatörzsek elkülönülnek egymástól. A tejtermékekből származó izolátumok azonosíthatóak voltak az adatbank segítségével, és a kapott eredmények megerősítették a hagyományos módon történt identifikálás eredményeit.

Mindezek igazolják Dlačhy és társai (1999) eredményeit, akik a ribotipizálást élelmiszerekből származó izolátumok faji azonosítására sikeresen alkalmazták. Tekintettel az azonos fajba tartozó izolátumok által adott azonos gélmintázatra, a kapott eredményeink megerősítik Petersen és Moller (2001) tapasztalatait is, akik többek között a ribotipizálást *Debaryomyces hansenii* fajba tartozó izolátumok összehasonlítására próbálták használni, de törzsi szinten történő azonosításra alkalmatlannak találták ezt a módszert.

#### 5.5. A leggyakoribb élesztőfajok törzseinek megkülönböztetése RAPD-PCR és microsatellite-PCR módszerekkel

Az azonos fajokba tartozó izolátumok további vizsgálatához a Random Amplified Polimorphic (RAPD)-PCR analízist alkalmaztam, OPE 16 RAPD primer felhasználásával. Az eredmények alapján elmondható, hogy a kapott DNS szakaszok egyértelmű, intenzív mintázatokat mutatnak az agaróz gélben. A vizsgálat során nyert ujjlenyomatok között mind a három faj esetén megfigyelhetünk egyformákat, így a DNS mintázatok alapján megszerkesztett dendogram mindhárom fajnál is több esetben is teljes azonosságot mutat.

Az izolátumok nagyobb mértékű megkülönböztetése érdekében M 13 microsatellite primer segítségével microsatellite-PCR analízist is végeztem. A kapott eredményeket és az OPE 16 primer segítségével elvégzett RAPD-PCR eredményeit összevonva megszerkesztettem mind a három élesztőfaj törzseinek dendogramját. A *Debaryomyces hansenii* élesztőfajba tartozó izolátumok összevont dendogramja alapján megfigyelhető, hogy törzsei között nincsenek teljesen egyformák, ellentétben azzal, amit az OPE 16 primernél tapasztaltam. A *Geotricum candidum* esetén a vizsgált 13 törzs között volt ugyan 3 azonos, de a többi izolátum egymással való hasonlósági foka változó. A *Yarrowia lipolytica* izolátumok

közül azonban három esetben is 2-2 egyformának bizonyult. Igaz, hogy a *Yarrowia lipolytica* a vizsgált tejtermékekben a *Debaryomyces hansenii* és a *Geotrichum candidum* fajoknál jóval kisebb mértékben, mindössze 6 izolátummal képviselte magát. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a Magyarországon gyártott tejtermékekből izolált *Debaryomyces hansenii* és *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek nagyfokú diverzitást mutatnak. A *Yarrowia lipolytica* törzsek változatossága ennél jóval kisebb mértékű.

A kapott eredmények alapján, ellentétben Prillinger és munkatársai (1999) valamint Andrighetto és munkatársai (2000) eredményeivel, a RAPD analízist nem találtam az izolátumok faji szinten történő azonosítására alkalmas módszernek az egy fajon belüli élesztőtörzsek ujjenyomatának sok esetben előforduló különbözősége miatt. Ellenben, tekintettel a vizsgált fajokba tartozó törzsek legnagyobb része esetén kapott nagyfokú diverzitásra, a RAPD analízis OPE 16-os, és a microsatellite-PCR M13 primert használva, a tejtermékekből származó izolátumok törzsi szinten való megkülönböztetésére, tipizálására megfelelő módszernek tűnik.

Megfigyelhető, hogy sok esetben az ugyanattól a gyártótól és ugyanabból a tejterméktípusból származó törzsek között számottevő a különbség, ugyanakkor nagyon sokszor különböző gyártótól, illetve különböző tejterméktípusból származó törzsek között azonosságot, vagy nagyfokú hasonlóságot tapasztaltam. Így az a célom, hogy összefüggést találjak a gyártók, a tejtermékek típusai, valamint az izolált élesztőtörzsek egymással való hasonlósági foka között, nem járt sikerrel.

#### **5.6. Hat baromfihúsból származó izolátum tulajdonságainak eltérései a *Yarrowia lipolytica* törzsektől**

A fiziológiai tulajdonságaikat összehasonlítva a leghatározottabb különbség, amely a *Yarrowia lipolytica* CBS 6124 jelű törzs (Barnett et al., 2000; Kurtzman, 1998) és a hat, baromfihúsból származó élesztőtörzs között az volt, hogy a *Yarrowia lipolytica*-val ellentétben az utóbbiak az N-acetil-D-glükóزامint nem volt képesek szénforrásként hasznosítani. Továbbá a vizsgált hat élesztőtörzs nem igényelt vitaminok hozzáadását a növekedésükhöz, míg a *Yarrowia lipolytica* törzsek nem, vagy csak nagyon lassan nőnek vitaminok nélkül (Barnett et al., 2000). Más különbségeket is találtunk, amelyek azonban elletmondásosak voltak. Például három tanulmányozott törzs hasznosítja a trehalózt, a másik három törzs változó eredményt adott erre a tesztre (ismétlés esetén néhányszor +, míg néhányszor – eredményt kaptunk).

Az ureáz próba negatív volt a vizsgált törzsek esetén, hasonlóan a *Yarrowia lipolytica* típustörzséhez. Habár néhány kutató a *Yarrowia lipolytica*-t ureáz pozitív fajnak tartotta, Boot és Vishniac (1987) a *Yarrowia lipolytica* típustörzsét ureáz negatívnak írták le és az ő eredményüket Péter és Deák (1991) további törzsek vizsgálatával megerősítették. Ők azt is megállapították, hogy a Cristensen urea agar színváltozása az általuk vizsgált *Yarrowia lipolytica* esetén a nem specifikus lúgosodási reakciónak tulajdonítható, nem az ureáz aktivitásnak.

A 18S rDNS NS1 és ITS 2 primerekkel történő megsokszorozásakor nyert fragmetek *Hae III* enzimes hasításával kapott ujjlenyomatokat összehasonlítva azok az élesztőtörzsek, amelyek nem tudták az N-acetil-D-glükóزامint szénforrásként hasznosítani, egymással azonos, de a *Yarrowia lipolytica* típustörzsétől nagymértékben eltérő ujjlenyomatot adtak.

A NCAIM Y.01482, a NCAIM Y.01486, a NCAIM Y.01489 törzsek és a *Y. lipolytica* típustörzs 26S rDNS - ének D1/D2 doménje szekvenálásával kapott eredmények megerősítették, hogy ez esetben egy eddig le nem írt, a *Yarrowia lipolytica*-val szoros rokonságban álló új élesztőfajról van szó, amely - nevében az izolálás forrására utalva - a *Candida galli* nevet kapta (Péter et al, 2004).

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A tejtermékekben a készítésük során nélkülözhetetlen szerepet játszó baktériumok, elsősorban a tejsavbaktériumok mellett az élesztők is megtalálhatók. Néhány készítmény erjesztésében és egyes sajtfélék készítésében játszott hasznos szerepük egyre inkább ismerté válik, nagymértékű elszaporodásuk azonban a termékek romlását okozhatja.

Kutatómunkám célja a tejtermékekben előforduló élesztőgomba fajok és törzsek hagyományos és molekuláris módszereken alapuló identifikálása, elkülönítése és osztályozása volt, amely során adatokat kaptam a Magyarországon kereskedelmi forgalomban kapható tejtermékek élesztőbiótájának összetételéről, amelyről eddig semmi információval nem rendelkezünk. Emellett a kidolgozott, alkalmazott módszerek közül kiválasztottam azokat, amelyek a jövőben rutinszerű felhasználásra ajánlható, gyors és olcsó módszerek lehetnek.

### 6.1. Szelektív táptalajok összehasonlítása az élesztőizolátumok gyűjtéséhez

Tizenegy szelektív táptalajt hasonlítottam össze élesztőizolátumok tejtermékekből történő gyűjtésére való alkalmasságuk szempontjából. A vizsgálathoz az élesztőket, baktériumokat és *Penicillium roquefortii* penészgombát is tartalmazó márványsajtot választottam, mert az élesztőgombák tejtermékekből való számlálására és izolálására használt táptalajokkal szembeni követelmények - a baktériumok kifejlődését gátolniuk, a penészek növekedését csökkenteniük, az élesztők növekedését elősegíteniük kell - ezzel a sajtfélével megfelelőképpen vizsgálhatóak voltak.

A vizsgált táptalajok élesztő telepszámainak kéttényezős varianciaanalízissel ( $P < 0.05$ ) összehasonlítva táptalajok három homogén csoportot alkottak (1. DG18, MES, RBC, DRBC; 2. MEP, OGGY, MOL, YGCO; 3. MEOX, YEE, MOPR), egymást átfedő konfidencia intervallumokkal. Statisztikai különbségek csupán az első és a harmadik csoport között mutatkoztak.

A kapott eredmények szerint az élesztőgombák különböző élelmiszerfajtából történő izolálására használt szelektív táptalajok nem mindegyike ajánlható tejtermékekből való izolálásra. A vizsgált táptalajok közül a MOL (molybdate), a MOPR (molybdate with calcium propionate) és a YGCO (yeast extract glucose chloramphenicol oligomycin) agar nem gátolta megfelelően a penésztelepek növekedését, a MES (malt extract agar supplemented with sodium-chloride) és a YEE (yeast extract agar with eugenol) nem akadályozta meg a baktériumok kifejlődését, sőt az utóbbi sok esetben jórészt baktériumokkal teljesen fedett volt. Az ökörepe tartalmú MEOX (malt extract agar with ox-bile) pedig egyik feltételnek sem tett

eleget. Az RBC (rose bengal chloramphenicol), a DRBC (dichloran rose bengal chloramphenicol), az OGGY (oxytetracycline gentamicin glucose yeast extract), a MEP (malt extract biphenyl) és a DG18 (dichloran 18 % glycerol) agar volt a leghatékonyabb az élesztők izolálásában, mivel ezek mind a három, fent említett követelménynek eleget tettek. A könnyű kezelhetőségükért – ami az egyik fő szempont volt a további munkámhoz legalkalmasabb táptalaj kiválasztásánál – utóbbiak közül a kereskedelmi forgalomban is kapható RBC és DRBC táptalajokat találtam a legmegfelelőbbnek a vizsgált táptalajok közül.

## **6.2. A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása hagyományos módszerrel**

Az élesztőizolátumok gyűjtése különböző gyártótól származó többféle tejterméktípusból történt az egyik legmegfelelőbbnek ítélt táptalaj, a DRBC agar segítségével, majd az azonosításukat a hagyományos teszteken alapuló egyszerűsített identifikációs rendszer (SIM) (Deák, 1998) felhasználásával végeztem el.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy a hazai tejtermékekből mintegy 27 élesztőfajt sikerült izolálnom, melyek közül a vezető helyen a fehérje- és zsírbontó tulajdonsággal rendelkező *Debaryomyces hansenii*, a *Geotrichum candidum* és a *Yarrowia lipolytica* fajok szerepeltek. Az általam izolált élesztőfajok majdnem teljes mértékig megegyeztek irodalomban leírt, más európai országok tejtermékeiből származó élesztőfajokkal.

Az egyszerűsített identifikáláshoz használt SIM rendszer segítségével az izolátumokat kettő kivételével - mivel a *Candida lusitanae* és a *Trichosporon inkin* fajokat a rendszer adatbázisa nem tartalmazza - a hagyományos identifikáláshoz képest jóval rövidebb idő alatt sikerült meghatározni, ezért ez a módszer a tejtermékekből származó élesztők viszonylag gyors azonosítására alkalmas lehet.

## **6.3. A *Geotrichum candidum* törzsek összehasonlítása kariotipizálással**

Az egyik, tejtermékekben leggyakrabban előforduló élesztőfaj törzseinek összehasonlítását először kariotipizálás segítségével végeztem el. A törzsek között csupán egy 230 órán keresztül tartó futtatási program alkalmazásával sikerült bizonyos fokú polimorfizmust megfigyelni, a nagyméretű kromoszómák kicsi mozgékonyasága miatt. Mindezek alapján elmondható, hogy az elektroforézises kariotipizálás az alkalmazott futtatási körülmények mellett - tekintettel a kromoszómákat tartalmazó blokkok elkészítésének nagy munka - és időigényére, a hosszú futtatási időre -, az olyan nagy kromoszómaméretű

élesztőfajok, mint a *Geotrichum candidum* törzseinek összehasonlítására alkalmas molekuláris gyorsmódszerek közé nem sorolható.

#### **6.4. A tejtermékekből származó élesztőfajok és törzsek azonosítása és összehasonlítása molekuláris gyorsmódszerek segítségével**

##### **6.4.1. Az izolátumok faji szintű azonosítása ribotipizálás alkalmazásával**

A tejtermékekből származó izolátumok molekuláris módszerrel történő azonosításához első lépésként a hagyományos módon történő identifikálásuk eredménye alapján kapott élesztőfajok referenciatörzsek ribotipizálását végeztem el. A módszer során az élesztők 18S rDNS-ét és az azzal határos ITS1 részeit sokszoroztam meg NS1 és ITS2 primerek felhasználásával, majd a kapott DNS szakaszokat *Hae III* és *Msp I* restrikciós endonukleázokkal hasítottam. Az így nyert fragmentek elektroforetikus elválasztásával kapott gélmintázatok különböző fajok esetén eltértek egymástól, amelyek alapján Molecular Analysist számítógépes gélkiértékelő program segítségével megszerkesztettem a referenciatörzsek molekuláris dendogramját. Az izolátumok ribotipizálását a referenciatörzsekkel megegyező módon végeztem el, majd az említett program alkalmazásával a molekuláris dendogramba illesztettem ezeket. A kapott eredmények a hagyományos módon történő azonosítás során nyert eredményeket megerősítették.

Mivel a kidolgozott adatbázis a Magyarországon gyártott tejtermékekben leggyakrabban előforduló élesztőfajokat tartalmazza, ezért bármennyi izolátum azonosítására ehhez hasonló módon alkalmazható. A módszer gyorsan és viszonylag olcsón kivitelezhető, ezért a tejtermékekből származó izolátumok rutinszerű, gyors identifikálására alkalmas lehet, szemben a hosszadalmas tenyésztési eljárásokkal.

##### **6.4.1. Az izolátumok törzsi szintű összehasonlítása RAPD-PCR és microsatellite-PCR segítségével**

A további vizsgálataim során a szintén polimeráz láncreakció alapú Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR és a microsatellite-PCR módszereket használtam, kétféle céllal. Az egyik olyan primerek keresése volt, amelyek segítségével a magyarországi tejtermékekben leggyakrabban előforduló *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* és *Yarrowia lipolytica* élesztőfajokba tartozó izolátumok törzseit meg lehet egymástól különböztetni. A másik célom az ezekben a fajokba tartozó élesztőtörzsek rokonsági fokának a

jellemzése volt a RAPD-PCR és a microsatellite-PCR analízis során kapott eredmények alapján elkészített dendogramok segítségével.

A vizsgálataim során az OPE 16 random - és az M 13 microsatellite primert találtam erre megfelelőnek, mivel segítségével a legtöbb esetben megfelelő szétválasztást tudtam elérni a vizsgált törzsek között.

Az OPE 16 primerrel és az M 13 primerrel elvégzett RAPD-PCR és microsatellite-PCR analízis eredményeinek összevonásával kapott dendogramok alapján mind a három faj törzseinél bebizonyosodott, hogy ebben az esetben nagyobb diverzitás figyelhető meg egy-egy faj törzsei között, mint amikor csak az OPE 16 primerrel vizsgáltam azokat. A *Debaryomyces hansenii* faj esetén azonos törzsek nem is voltak. A *Geotrichum candidum* törzsekből 2-2 törzs volt azonos, a többi izolátum egymástól való hasonlósági szintje különböző mértékű volt. A *Yarrowia lipolytica* törzsek diverzitása ennél kisebb mértékű volt, de összehasonlítva az OPE 16 primerrel végzett RAPD analízis eredményeivel, ebben az esetben is a törzsek nagyobb mértékben különböztek egymástól.

A kapott eredmények alapján a RAPD-PCR és a microsatellite-PCR analízist a tejtermékekből izolált törzsek elválasztására alkalmas módszernek bizonyult, az egy fajon belüli mintázat változatossága miatt azonban fajsztípus azonosításra nem ajánlható.

#### **6.4.2. A *Yarrowia lipolytica* törzsek összehasonlítása baromfihúsból származó izolátumokkal**

Hazai tejtermékekben az egyik leggyakoribb élesztőfajnak a *Yarrowia lipolytica* bizonyult. Ennek a törzseit egy másik élelmiszertípusból (baromfihúsból) származó izolátumokkal hasonlítottam össze molekuláris vizsgálatokkal. Ehhez először a ribotipizálást alkalmaztam. A kilenc, baromfihúsból származó izolátum közül - váratlanul - hat esetén a *Hae III* enzimmel való hasítás után kapott ujjlenyomat eltért a többi izolátum és a referenciatörzs ujjlenyomatától. Az izolátumokat tovább vizsgálva, a fiziológiai tulajdonságaikban is egyértelmű különbségek mutatkoztak: a hat törzs a többivel ellentétben nem hasznosította az N-acetil-glükózamint, valamint a növekedéséhez nem igényelte vitaminok hozzáadását. A NCAIM Y01482, NCAIM Y01486, NCAIM Y01489 jelű törzsek és a *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y00591 típus-törzs 26S rDNS-ének D1/D2 doménjét megszekvenáltatva a köztük lévő genetikai különbséget megerősítettük. A kapott szekvenciákat a GenBank adatbázisban helyeztük el, az izolátumokat a *Candida galli* néven új fajként írtuk le (Péter, 2004).

## 6.5. A vizsgálatok jelentősége

Hazai tejtermékek körében ilyen részletes, molekuláris mélységű vizsgálatokra korábban nem került sor. Eredményeim igazolták, hogy az élesztőgombák a hazai tejtermékek mikrobiotájában rendszeresen megtalálhatók. Közreműködésük néhány tejtermékféle, például a kefir és néhány lágy sajtféle elkészítésénél nélkülözhetetlen, a gazdasági hasznuk mellett azonban a tejtermékek romlásával okozott kár is jelentékeny lehet.

A tejtermékek higiéniai és mikrobiológiai követelményeit illetően az élesztőszám nincs rendeletben és jogszabályban meghatározva, az általuk okozott romlás megakadályozása, illetve késleltetése miatt azonban szükségesnek látom a tejfeldolgozó üzemekben a termékek mikrobiológiai minőségének üzemi belső ellenőrzését az élesztők vonatkozásában is elvégezni.

Ezért az élesztők tejtermékekből történő izolálására legalkalmasabbnak talált szelektív táptalajok, a Magyarországon gyártott tejtermékek élesztőbiotájának összetételéről kapott adatok, a tejtermékekből származó izolátumok faji- és törzsi szintű azonosítására ajánlott hagyományos és molekuláris módszerek nemcsak az alapkutatásban, hanem a tejpari minőség-ellenőrzés során is hasznosíthatóak lehetnek a jövőben.

## 7. SUMMARY

Besides bacteria, in particular lactic acid bacteria which play an essential role in the production of dairy products, yeasts can be regularly found within their microbiota. Information is increasing on the important role of yeast in the preparation of some fermented products and in the ripening of certain cheeses, and also on the spoilage of dairy products, that may be caused by their excessive growth.

My research was inspired by the complete lack of information on yeasts in Hungarian dairy products. Hence, my aim was to identify, differentiate and classify the yeasts species and strains by using traditional and molecular methods in order to obtain data about the composition of yeast biota of dairy products available in the Hungarian market. In addition, effective rapid and cheap methods were selected with the aim of making them available for routine use in dairy industrial practice.

### 7.1. Comparison of selective media for the isolation of yeasts

Eleven selective media were compared for the purpose of isolation of yeasts from dairy products. Media should meet the requirements to permit the recovery of all kinds of yeasts while inhibiting bacterial growth and reducing fungal spreading. The fulfilment of these requirement could be investigated comprehensively by testing samples of a Roquefort-type cheese containing both yeasts and bacteria as well as the mould *Penicillium roquefortii*.

The total counts obtained on different media were subjected to two-factorial analysis of variance, and statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) were found between them. All media except one could be divided into three homogenous groups with overlapping confidence intervals. YEE agar containing eugenol was a clear outlier in that it gave significantly higher counts due to the growth of bacteria.

According to the results, not every one of the mycological media tested can be recommended for use to isolate yeasts from dairy products. The development of moulds was not suppressed satisfactorily on MOL (molybdate), MOPR (molybdate with calcium propionate) and YGCO (yeast extract glucose chloramphenicol oligomycin) media. As to the inhibition of bacteria, MES (malt extract agar supplemented with 4 % NaCl) and YEE (yeast extract eugenol) proved to be inefficient, moreover the latter in some cases was mostly covered by bacteria. MEOX (malt extract agar with ox-bile) medium failed to meet both requirements. RBC (rose bengal chloramphenicol), DRBC (dichloran rose bengal chloramphenicol), OGGY (oxytetracycline gentamicin glucose yeast extract), MEP (malt extract biphenyl) and DG18

(dichloran 18 % glycerol) media proved to be the most efficient for the isolation of yeasts, as they fulfilled all three requirements mentioned above. For convenience of use, commercially available media such as RBC and DRBC were scored the most suitable for isolation of yeasts from dairy products.

## **7.2. Identification of yeasts originating from dairy products based on traditional tests**

For the purpose of isolation of yeast, samples from various commercial dairy products produced in different factories were plated on one of the most convenient media, DRBC agar. Identification was performed by using the simplified identification method (SIM) (Deák, 1998) based on traditional tests.

The isolates collected from Hungarian dairy products were assigned to 26 species. The most frequent isolates were *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* and *Yarrowia lipolytica* species possessing lipolytic and proteolytic properties. The yeasts composition was almost completely similar to yeast populations of dairy products produced in other European countries.

Identification of the isolates using SIM was achieved more rapidly than with traditional methods, with the exception of the species *Candida lusitanae* and *Trichosporon inkin*, which are not included in the database of SIM. Nevertheless, this method can be convenient for the relatively rapid identification of yeasts originating from dairy products.

## **7.3. Comparison of *Geotrichum candidum* strains by karyotyping**

Strains of this yeast, one of the species most frequently occurring in dairy products, were compared first by karyotyping. A certain degree of polymorphism of strains was observed only when an electrophoresis program lasting for 230 hours was used, because of the weak mobility of huge chromosomes. For this reason karyotyping cannot be recommended as an easy rapid method for comparison of yeasts strains with large-sized chromosomes like those of *Geotrichum candidum*.

## **7.4. Rapid molecular methods used for the identification and comparison of yeasts species and strains occurring in dairy products**

### **7.4.1. Species level identification of isolates by ribotyping**

For the purpose of identification of isolates occurring in dairy products first the ribotyping of the reference strains was performed which were identified previously according to the results of SIM. For the amplification of 18S rDNA with the neighbouring ITS1 region NS1 and ITS2 primer pair was used, and the products were digested with *Hae III* and *Msp I* restriction endonucleases. Digestion patterns obtained by the electrophoretic separation of restriction fragments were different in various species. The dendogram of reference strains was composed using Molecular Analysis softver. Ribotyping of he isolates was made on the same way and data were included into to the molecular dendogram of reference strains using same softver. The results obtained by the simplified identification were confirmed on the basis of the data of ribotyping.

As the database contains the most frequent yeasts species isolated from Hungarian dairy products, it can be used for the identification of additional isolates. Considering the rapid and relatively cheap performance of this method, it can be useful for routine, rapid identification of yeasts occurring in dairy products as compared to the lengthy traditional method.

### **7.4.2. Comparison of isolates at strain-level using RAPD-PCR and microsatellite-PCR**

In the course of further investigations, Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD) and microsatellite-PCR was used. One of purposes was to find primers, which can be used for the strain-level differentiation of the species isolated most frequently in Hungarian dairy products, i. e. *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* and *Yarrowia lipolytica*. The other aim was to determine the degree of relationship among the isolates belonging to these species, based on the results of RAPD- and microsatellite-PCR.

The random OPE 16 primer and microsatellite M 13 proved to be appropriate for the discrimination of the isolates in most cases.

According to the phylogenetic analysis using the summarized results of RAPD and microsatellite-PCR with primers OPE 16 and M 13, it turned out that a larger degree of diversity could be observed than using only OPE 16. In the case of *Debaryomyces hansenii* no

similar strains were detected. Among *Geotrichum candidum* strains, two pairs of strains were found to be similar whereas the degree of similarity among the others varied. The diversity of *Yarrowia lipolytica* strains was smaller, but even in this case RAPD and microsatellite-PCR analysis using both primer produced larger differences than OPE 16 primer alone.

From these results it can be concluded that RAPD and microsatellite-PCR analysis is an efficient method for the differentiation of yeast strains isolated from dairy products, but it can not be recommended for the identification at species level because of the variation of patterns observed within the same species.

#### **7.4.3 Comparison of *Yarrowia lipolytica* strains to isolates originating from poultry**

*Yarrowia lipolytica* proved to be one of the most frequent yeast species in Hungarian dairy products. Its strains were compared using molecular methods to isolates originated from an other type of food (poultry). First, they were studied by ribotyping. Patterns obtained after digestion using *Hae III* restriction endonuclease, six isolates out of nine were different from the rest of isolates and the reference strain of *Yarrowia lipolytica*. Further examination showed clear-cut differences also in their physiological properties: six strains in contrast to the others were not able to assimilate N-acetyl-glucoseamin, and did not require external vitamins for growth. The genetic differences between the group of the six strains and the type strain of *Yarrowia lipolytica* were confirmed by sequencing the D1/D2 domain of 26S rDNA. Sequences of the strains NCAIM Y01482, NCAIM Y01486 and NCAIM Y01489 differed from the type stain of *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y00591. DNA sequences of this hitherto unknown yeasts were submitted to the GenBank, and the new species, represented by these six strains was described as *Candida galli*.

#### **7.5. The significance of investigations**

Until now, no detailed and thorough molecular investigations have been made on yeasts of Hungarian dairy products. It was demonstrated by the results obtained, that yeasts regularly occurred in the microbiota of Hungarian dairy products. Their contribution is essential in the production of certain dairy products, resulting in economic profit but on the other hand the loss caused by spoiling of dairy products can be considerable.

However regarding the hygienic and microbiological requirements of dairy products, the yeasts count is not regulated by orders and laws, in order to prevent or postpone the

spoilage caused by them, it seems to be necessary to expand the private control of the microbiological quality of products to yeasts in dairy factories.

This underlines the importance of microbiological testing and the methodological studies presented here. By the comparison of selective media, the most suitable one has been recommended for isolation of yeasts from dairy products. Data were obtained about the composition of yeast biota in Hungarian dairy products. The traditional and molecular methods were used and recommended for identification of yeasts isolated from dairy products. They can be differentiated on both species and strain level. All these results can be useful not only for the basic research, but also for the quality control in dairy factories, and for the assessment of spoilage risk caused by yeasts.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

**Andrighetto, C., Psomas, E., Tzatenakis, N., Suzzi, G. and Lombardi, A. (2000):** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology* **30**, pp. 5-9

**Asakura, K., Iwaguchi, S.I., Homma, M., Sukai, T., Higashide, K. and Tanaka, K. (1991):** Electrophoretic karyotypes of clinically isolated yeasts of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Journal of General Microbiology* **137**, pp. 2531-2538

**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. *International Journal of Food Microbiology* **24**, pp. 249-260

**Baleiras Couto, M.M., Vogels J.T.W.E, 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. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, pp. 525-535

**Barioller, C. and Smidth, J.L. (1990):** Contribution à l'étude de l'origine des levures du fromage de Camembert. *Le Lait*, **70**, pp. 67-84

**Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (2000):** Yeasts: Characteristics and identification. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge

**Beckers, H.J., De Boer, E., Dijkman, K.E., Hartog, B.J., Van Kooij, J.A., Kuik, D., Mol, N., Nooitgedagt, A.J., Northolt, M.D. and Samson, R. (1986):** Comparison of various media for enumeration of yeasts and molds in food. –in: **King, A.D., Jr, Pitt, J.I, Beuchat, L.R. and Corry, J.E.L. (Eds)** Methods for the mycological examination of food. *Plenum, New York*, pp. 66-76

**Berger, C., Khan, J.A., Molimard, P., Martin, N. and Spinnler, H.E. (1999):** Production of sulfur flavors by ten strains of *Geotrichum candidum*. *Applied Environmental Microbiology*, **65**, pp. 5510-5514

**Besancon, X., Smet, C., Chabaliér, C., Rimevale, M., Reverbel, J., P., Ratomahenina, R. and Galzy, P.** (1992): Study on surface yeast flora of Roquefort cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **17**, pp. 9-18

**Beuchat, L.R.** (1993): Selective media for detecting and enumerating food borne yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, **19**, pp. 1-14

**Beuchat, L.R.** (1998): Progress in conventional methods for detection and enumeration of foodborne yeasts. *Food Technology and Biotechnology* **36**, pp. 267-272

**Boer, E. and Beumer, R. J.** (1999): Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **50**, pp. 119-130

**Bostock, A., Khattak, M.N., Matthews, R. and Burnie, J.** (1993): Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* **139**, pp. 2179-2184

**Booth, J.L. and Vishniac, H.S.** (1987): Urease testing and yeast taxonomy. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, pp. 396-404

**Cappa, F. and Coconcelli, P.S.** (2001): Identification of fungi from dairy products by means of 18S rRNA analysis. *International Journal of Food Microbiology* **69**, pp. 157-160

**Carle, G. F. and Olson, M.V.** (1985): An electrophoretic karyotype for yeasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **82**, pp. 3756-3760

**Caruso, M., Capece, A., Salzano, G. and Romano, P.** (2002): Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Letters in Applied Microbiology* **34**, pp. 323-328

**Deák, T.** (1991): Foodborne yeasts. *Advanced Applied Microbiology*, **36**, pp. 179-278

**Deák, T.** (1992): Media for enumerating spoilage yeasts- a collaborating study – in: Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I and King, A.J.Jr (Eds) *Modern methods in Food Microbiology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 31-38

**Deák, T., Beuchat, L.R., Guerzoni, M.R., Lillie, A., Rohm, P.H., Schnürer, F., Tabajdi, P.V. and Westphal, S.** (1998): Collaborative study on media for enumeration of yeasts in foods. *International Journal of Food Microbiology* **43**, pp. 91-95

**Deák, T.** (1995): Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science and Technology* **6**, pp. 287-292

**Deák, T.** (1998): Élesztőgombák. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest

**Deák, T.** (2003): A humángenom-szekvencia és az élelmiszer-mikrobiológia. *Élelmészeti ipar* **10**, pp. 294-300

**Deák, T. and Beuchat, L. R.** (1987): Identification of foodborne yeasts. *International Journal of Food Protection* **50**, pp. 243-264

**Deák, T. and Beuchat, L.R.** (1993): Comparison of the SIM, API 20C and ID 32 systems for identification of yeasts isolated from fruit juice concentrates and beverages. *Journal of Food Protection* **50**, pp. 585-592

**Deák, T., Chen, J. and Beuchat, L.R.** (2000): Molecular characterization of *Yarrowia lypolytica* and *Candida zeylanoides* isolated from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, pp. 4340-4344

**Deák, T. and Beuchat, L. R.** (1996): Handbook of food spoilage yeasts. CRC Press, Boca Raton, USA

**Demarigny, Y., Berger, C., Desmasures, N., Gueguen, M. and Spinnler, H.E.** (2000): Flavour sulphides are produced from methionine by two different paths by *Geotrichum candidum*. *Journal of Dairy Research* **67**, pp. 371-380

**Devoyod, J.J.** (1990): Yeasts in cheese-making.-in: **Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M.** (Eds) *Yeasts Technology*. Springer-Verlag, Helderberg, pp. 229-240

**Dlauchy, D., Tornay-Lehoczki, J. and Péter, G.** (1999): Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, pp. 445-453

**Eliskases-Lechner, F. and Prillinger, H.** (1996): Inhibition of mould growth by oligomycin during quantitative analysis of yeasts. *J. Dairy Research* **63**, pp. 483-488

**Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. and Statzell-Tallman, A.** (2000): Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, pp. 1351-1371

**Fernandez-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E. and Querol, A.** (2001): Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* **70**, pp. 1-10

**Fleet, G.H.** (1990): Food spoilage yeasts. In: *Yeast Technology* (Spencer, J.F.T.-Spencer, D.M., eds.). Springer Verlag, Berlin pp. 124-166

**Fleet, G.H.** (1992): Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12**. pp. 1-44

**Fleet, G.H. and Mian, M.A.** (1987): The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, **4**, pp. 145-155

**Gente, S., Desmasures, N., Panoff J.M. and Guéguen, M.** (2000): Genetic diversity among *Geotrichum candidum* strains from various substrates studied using RAM and RAPD-PCR. *Journal of Applied Microbiology* **92**, pp. 491-501

**Gente, S., Desmasures, N., Jacopin, C., Plessis, G., Beliard, M., Panoff, J.M. and Guéguen, M.** (2002): Intra-species chromosome-length polymorphism in *Geotrichum candidum* revealed by pulsed field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* **76**, pp. 127-134

**Guého, E., Smith, M.Th. and de Hoog, G.S.** (1998): *Trichosporon* Behrend In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W.: *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 854-872

**Hoog, G.S., Smith, M.Th. and Guého, E.** (1998): *Geotrichum* Link: Fries In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W.: *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 574-579

**Heard, G. M. and Fleet, G. H.** (1990): A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, pp. 447-451

**Hoffman, C.S., Winston, F.,** (1987): A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, pp. 267-272

**Innis, M.A. and Gelfand, D.H.** (1990): PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California

**Ismail, S.A.S, Deák, T., Abd El-Rahman, H.A., Yassien, M.A.M. and Beuchat, L.R.** (2000): Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology* **62**, pp. 113-121

**Jakobsen, M. and Narvhus, J.** (1996): Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* **6**, pp. 755-768

**Johston, J. R., Contopoulou, C. R., Mortimer, R. K.** (1988): Karyotyping of yeasts strains of several genera by Field Inversion Gel Electrophoresis. *Yeasts* **4**, pp. 191-198

**Kim, J., Marshall, M.R. and Wei, C.H.** (1995): Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agrical. Fd Chem.*, **43**, pp. 2839-2845

**King, A.D.Jr, Hocking, A.D. and Pitt, J.I.** (1979): Dicloran-Rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Enviromental Microbiology*, **37**, pp. 959-964

**King, A.D., Pitt, J.I., Beuchat, L.R. and Corry, J.L.E.** (1986): Methods for the mycological examination of foods. Plenum Press, New York, pp. 1-315

**Kracher, S.J.** (1995): *Molecular Biology a Project Approach*, pp.215-227. San Diego, USA: Academic Press, Inc.

**Kurtzman, C. P.** (1984): Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparison of deoxiribonucleic acid relatedness. *Antonie van Leeuwenhoek* **63**, pp. 165-172

**Kurtzman, C.P.** (1998): *Yarrowia van der Walt* and *von Arx*. In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds) *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 420-421

**Kurtzman, C.P., and Blanz, P.A.** (1998): Ribosomal RNA/DNA sequence comparisons for assessing phylogenetic relationships. In: *The Yeast, a Taxonomic Study* (C.P. Kurtzman- J.W. Fell, eds) 4<sup>th</sup> ed., pp.69-75. Elsevier, Amsterdam

**Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J.** (1998): Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts from Analysis of Nuclear Large Subunit (26 S) Ribosomal DNA Partial Sequences. *Antonie van Leewenhoek* **73**, pp. 331-371

**Lachance, M.A.** (1998): *Kluyveromyces van der Walt* emend. van der Walt In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W.: *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 227-247

**Lavallée, F., Salvas, Y., Lamy, S., Thomas, D.Y., Degrée, R. and Dulau, L.** (1994): PCR and DNA fingerprinting used as a quality control in the production of wine yeast strains. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**, pp. 86-91

**Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, J.F., Peinardo, J.M. and Spencer-Martins, I.** (1992): Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology* **14**, pp. 279-283

- Martinez, P. Codón, A.C., Pérez, L. and Benítez, T.** (1995): Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast population. *Yeast* **11**, pp. 1399-1411
- Meaden, P.** (1990): DNA fingerprinting of brewer's yeast: current perspective. *Journal of the Institute of Brewing* **96**, pp. 195-200
- Moleyar, V. and Narasimham, P.** (1992): Antibacterial activity of essential oil components. *International Journal of Food Microbiology*. **16**, pp. 337-342
- Nakase, T., Suzuki, M., Phaff, H.J. and Kurtzman, C.P.** (1998): *Debaryomyces* Lodder and Kreger-van Rij Nom. Cons. In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. : *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 157-173
- Naumov, G., Naumova, E. and Gaillardin, C.** (1993): Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeasts isolated in France and in Italy. *Systematic and Applied Microbiology* **16**, pp. 274-279
- Pearson, B.M. and McKee, R.A.** (1992): Rapid identification of *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces balii* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *International Journal of Food Microbiology* **16**, pp. 533-542
- Péter, G. and Deák, T.** (1991): On the false positive urease activity of *Yarrowia lipolytica*. *Antonie van Leeuwenhoek* **60**, pp. 55-59
- Péter, G., Dlačny, D., Vasdinyei, R., Tornai-Lehocki, J. and Deák, T.** (2004): *Candida galli* sp. nov., a new yeast from poultry. *Antonie van Leeuwenhoek* (in press)
- Petersen, K.M., Møller, P.L.** (2001): DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**, pp. 11-24
- Praphailong, W., Van Gestel, M., Fleet, G.H. and Heard, G.M.** (1997): Evaluation of the Biolog system for the identification of food and beverage yeasts. *Letters in Applied Microbiology* **24**, pp. 455-459

- Prillinger, H., Molnár, O., Eliskases-Lechner, F. and Lopandic, K.** (1999): Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**, pp. 267-283
- Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D.** (1994): Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **21**, pp. 315-323
- Querol, A., and Ramon, D.** (1996): The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends in Food Science and Technology* **7**, pp. 73-78
- Rale, V.B. and Vakil, J.R.** (1984): A note on an improved molybdate agar for the selective isolation of yeasts from tropical fruits. *Journal of Applied Bacteriology*, **56**, pp. 409-413
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F and Bräuer, M.** (1992): Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, **28**, pp. 370-376
- Rohm, H. and Lechner, F.** (1990): Evaluation and reliability of a simplified method for identification of food-borne yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, pp. 1290-1295
- Romano, A., Casaregola., Torre, P. and Gaillardin, C.** (1996): Use RAPD and mitochondrial DNA RFLP for typing of *Candida zeylanoides* and *Debaryomyces hansenii* yeast strains isolated from cheese. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, pp. 255-264
- Roostita, R. and Fleet, G.H.** (1996): The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **28**, pp. 393-404
- Schwartz, D. C. and Cantor, C. R.** (1984): Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, pp. 67-75
- Sor, F. and Fukuhara, H.** (1989): Analysis of chromosomal DNA patterns of the genus *Kluyveromyces*. *Yeast* **5**, pp. 1-10
- Tempel, T. and Jakobsen** (1998): Yeasts associated with Danablu. *Int. Dairy Journal* **8**, pp. 25-31

**Tornai-Lehoczki, J. and Dlauchy, D.** (1996): An opportunity to distinguish species of *Saccharomyces* sensu stricto by electrophoretic separation of the larger chromosomes. *Letters in Applied Microbiology* **23**, pp. 227-230

**Tornai-Lehoczki, J. and Dlauchy, D.** (2000): Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology* **62**, pp. 37-45

**Vaughan-Martini, A., Martini, A. and Cardinali, G.** (1993): Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* **63**, pp. 145-156

**Vazquez, B.I., Fente, C., Franco, C.M., Vazquez., M.J. and Cepeda, A.** (2001): Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **67**, pp. 157-163

**Versavaud, A., Hallet, J. N.** (1995): Pulsed-field Gel electrophoresis combined with rare-cutting endonucleases for strain differentiation of *Candida famata*, *Kloeckera apiculata* and *Schizosaccharomyces pombe* with chromosome number and size estimation of the two former. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, pp. 303-309

**Vezinhet, F., Blodin, B. and Hallet, J. N.** (1990): Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification for enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, pp. 568-571

**Vilgays, R., and Hester, M.** (1990): Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* **172**, pp. 4238-4246

**Viljoen, J.J. and Greyling, T.** (1995): Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *International Journal of Food Microbiology* **28**, pp. 79-88

**Welthagen, J.J. and Viljoen B.C.** (1997): Comparison of ten media for the enumeration of yeast in dairy products. *Food Research International*, **30**, pp. 207-211

**White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.** (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, N. Gelgand, D., Snisky, J. and White, T (eds) PCR protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322

**Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tigney, S.V.** (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, pp. 6531-6536

**Yarrow, D.** (1998): Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds) *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4th<sup>ed</sup>. Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 77-100

#### **Jogszabályok és rendeletek:**

1/2003. (I. 8.) Földművelési és Vidékfejlesztési Minisztérium és Egészségügyi, Szociális és Családügyi Minisztérium együttes rendelete, 1. számú melléklet: A hőkezelt fogyasztói tej és a tej alapú termékek előállításának és minőségének élelmiszer-higiéniai követelményei

Magyar Élelmiszerkönyv, 2-51 irányelv, Tej és tejtermékek: Termelői nyerstej, azonosító szám: MÉ 2-51/1. pp.: 12-16

## 9. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Szakeikkek:

**Vasdinyei, R., Simonics, T., Mészáros, L., and Deák, T.** (2003): Comparison of different media for isolation and enumeration of yeasts occurring in blue veined cheese. *Acta Alimentaria* **32**. pp. 205-212

**Vasdinyei, R. and Deák, T.** (2003): Characterization of yeasts isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology* **86**. pp. 123-130

**Wade, W.N., Vasdinyei, R., Deák, T. and Beuchat, L.R.** (2003): Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabolic association of *Geotrichum candidum* with *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology* **86**. pp. 101-110

**Péter, G., Dlačny, D., Vasdinyei, R., Tornai-Lehocki, J. and Deák, T.** (2004): *Candida galli* sp. nov., a new yeast from poultry. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**. pp. 105-110

**Viljoen, B.C., Knox, A., Beuchat, L.R., Deák, T., Malfeito-Ferreira, M., Hansen, T.K., Hugo, A., Jakobsen, M., Loureiro, V., Lourens-Hatting, A. and Vasdinyei, R.** (2004): An interlaboratory evaluation of selective media for the detection and enumeration of yeasts from blue-veined cheese. *International Journal of Food Microbiology* **94**. pp. 9-14

Posztetek, előadások:

**Vasdinyei, R. és Deák, T.** (2001): Hazai tejtermékekben előforduló élesztőgombák. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2001. évi Jubileumi Nagygyűlése, Balatonfüred. Abstr. pp. 171

**Vasdinyei, R. and Deák, T.** (2002): Yeasts occurring in Hungarian dairy products. Second Hungarian Conference of Mycology, Szeged, Hungary. Abstract in: *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **49**. pp. 421-422

**Vasdinyei, R. and Deák, T. (2002):** Yeasts occuring in Hungarian dairy products. „Power of Microbes in Industry and Enviroment”, Croatian, Hungarian and Slovenian Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology, Opatija, Croatia. Abstr. pp. 48

**Vasdinyei, R. and Deák, T. (2002):** Yeasts occuring in Hungarian dairy products. Food Micro 2002, „Friends and Foes”, 18<sup>th</sup> Symposium of the International Comitee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH) Lillehammer, Norway. Abstr. pp. 262

**Vasdinyei, R., Simonics, T., Mészáros, L. és Deák T. (2002):** A tejtermékekben előforduló élesztőgombák számlálásához és izolálásához használt tápközegek összehasonlítása. „Tavaszi Szél” 2002, Fiatal Magyar Tudományos Kutatók és Doktoranduszok VI. Világtalálkozója, Gödöllő

**Vasdinyei, R. and Deák, T. (2002):** Yeasts occuring in Hungarian dairy products. Food Microbiology Symposium and Rapid Methods Workshop, River Falls, USA

**Vasdinyei, R. és Deák, T. (2002):** Tejtermékek élesztőizolátumainak élettani tulajdonságai és molekuláris jellemzői. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2002. évi nagygyűlése, Balatonfüred. MÉMP 17

**Vasdinyei, R. and Deák, T. (2003):** Characterization of yeasts isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, Hungary. Abstr. pp. 215

**Péter, G., Dlačny, D., Vasdinyei, R., Tornai-Lehocki, J. and Deák, T. (2003):** A *Yarrowia lipolytica*-like yeasts species of chicken origin. 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, Hungary. Abstr. pp. 100

**Vasdinyei, R. and Deák, T. (2003):** Identification of yeasts in Hungarian dairy products by their physiological and molecular characteristics. 14<sup>th</sup> International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary. Abstr. pp. 169

**Vasdinyei, R. és Deák, T. (2003):** Magyarországon gyártott tejtermékekből izolált élesztők azonosítása hagyományos és molekuláris módszerekkel. Lippay János – Ormos Imre – Vas Károly Tudományos Ülésszak, Budapest, Hungary. Abstr. pp. 168

**Wade, N.W., Vasdinyei, R., Deák, T. and Beuchat, L.R.** (2003): Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabolic association of *Geotrichum candidum* with *Salmonella*. 23<sup>rd</sup> International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, Hungary. Abstr. pp. 50

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Deák Tibornak a segítségéért, a tanácsaiért és a kedvességéért, mivel mindezekkel nagymértékben hozzájárult a doktori értekezésem elkészüléséhez.

Köszönet Dr. Maráz Anna tanszékvezetőnek a lehetőségért, hogy a Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszéken tölthettem doktorandusz éveimet, valamint a Tanszék összes dolgozójának és doktorandusz társaimnak a segítségükért, barátságukért.

Ezúton szeretném megköszönni a Törzsgyűjtemény dolgozóinak, Lehoczkiné dr. Tornai Juditnak, Dr. Dlauchy Dénesnek, Dr. Péter Gábornak a segítségüket.

Utoljára, de nem utolsósorban köszönet Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológia Tanszéke vezetőjének és Galgóczy László PhD hallgatónak a segítségükért.

