

**Hazai tejtermékekből származó élesztőgombák
jellemzése hagyományos és molekuláris
módszerekkel**

Doktori értekezés tézisei

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 Tsz.
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

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 kumis erjesztésén kívül, mely tejsavbaktériumok és élesztők mesterséges hozzáadásával történik, a tejtermékekbe az élesztőgombák természetes úton, a környezetből jutnak.

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).

Az utóbbi években egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak az élesztőgombák szerepének az egyes sajtffélék érlelésében. Elsősorban azért, hogy a tejsavbontásukkal a termék pH-ját megemelik, elősegítik egy savérzékeny baktériumbióta meglepedését. 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 sajtffélék ízének és illatának változatossága köszönhető (Berger et al. 1999; Demarigny et al. 2000).

Felismerve a tevékenységük e két fontos oldalát, világszerte megnőtt az érdeklődés az élelmiszerekben, így a tejtermékekben előforduló élesztőgombák tevékenysége iránt. A hazai adatok száma azonban igen kicsi, ezért elsődleges célul élesztőgombák Magyarországon gyártott készítményekből való izolálását, majd a

gyűjtött izolátumok hagyományos és molekuláris módszerekkel történő jellemzését tűztem ki.

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). Ezekben a táptalajokban a baktériumok gátlására kloramfenikolt, oxitetraciklint, gentamicint és számos más antibiotikumot használnak. 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. King és munkatársai (1979) a vizsgálataikhoz a penészgombák visszaszorításához dikloránt és bengálrózsát tettek a táptalajba.

A tejtermékekben az élesztők szintén más mikroorganizmusokkal együtt, vegyes tenyészetben fordulnak elő. Vizsgálataim legelső célja ezért az élesztőgombák tejtermékekből történő izolálásához a legmegfelelőbb táptalaj kiválasztása volt. Ehhez szelektív táptalajokat hasonlítottam össze az élesztők izolálására, számlálására való alkalmasságuk szempontjából.

Az egyes tejtermékffélék élesztőpopuláció-összetételének vizsgálatához nélkülözhetetlen az izolátumok meghatározása. A hagyományos azonosítási módszer morfológiai, élettani és biokémiai tesztet alkalmaz élesztők identifikálására, A pontos identifikációhoz használt tesztek száma általában 60-90 között változik. Ennek köszönhető, hogy ez a módszer rendkívül munkaigényes, tekintélyes szakmai tudást igényel, valamint jelentős időt kell fordítani az elvégzésére (Deák,1995). Léteznek gyorsabb, szintén fiziológiai vizsgálatokon alapuló, gyárilag elkészített identifikációs rendszerek, de ezeket elsősorban orvosi szempontból lényeges élesztőfajok meghatározására fejlesztették ki.

Deák és Beuchat (1993) egy egyszerűsített identifikációs módszert (SIM) dolgozott ki az élelmiszerekben romlást okozó élesztők meghatározására, amely előnyét az nyújtja, hogy jóval kevesebb, mintegy 30 teszt végzendő el az azonosításhoz és alkalmazásával egy hét alatt eredményhez juthatunk.

A molekuláris biológia nagymértékű fejlődése az utóbbi években új lehetőséget nyitott az élesztők identifikálására is. Számos molekuláris módszer alkalmas a különféle élelmiszertípusokból származó élesztők gyors identifikálására is. Az e célra leggyakrabban használt molekuláris módszerek a DNS homológia eljárás (Kurtzman, 1984), a restrikciós töredék hossz (RFLP) módszer (Meaden, 1990; Querol and Ramon, 1996) az elektroforézises kariotipizálás pulzáló elektromos mezőben (PFGE) (Naumov et al, 1993; Tornai-Lehoczki és Dlačny, 1996; 2000) a polimeráz láncreakción alapuló technikák közül ribotipizálás és a véletlenszerűen megsokszorozott DNS sokféleség (RAPD-PCR) módszer (Baleiras Couto et al, 1994; 1995; Romano et al., 1996; Dlačny et al, 1999; Prillinger et al, 1999; Andrighetto et al., 2000; Deák et al., 2000) és a riboszóma RNS szekvenálás (Cappa és Cocconcelli, 2001).

Kutatómunkám további célja hagyományos és molekuláris módszerek, így az egyszerűsített identifikációs rendszer (SIM, Deák és Beuchat, 1993), a kariotipizálás, a ribotipizálás, a RAPD-PCR és a microsatellite-PCR összehasonlítása volt az élesztőizolátumok faji, illetve törzsi szinten történő azonosítására való alkalmasságuk szempontjából.

Ezenkívül céлом volt még összefüggés keresése a vizsgált tejtermékek gyártója illetve a tejterméktípusok és a törzsi szintű azonosítás során kapott eredmények között, valamint az egyik, tejtermékekben leggyakrabban előforduló élesztőfaj törzseinek összehasonlítása más élelmiszertípusból származó, ugyanabba az élesztőfajba tartozó törzsekkel is.

2. Anyag és módszer

Referencia törzsek

Candida catenulata NCAIM Y1032, *Candida glabrata* CBS 138, *Candida lusitanae* CBS 6936, *Candida maltosa* CBS 5611, *Candida mesenterica* NCAIM Y1072, *Candida parapsilopsis* CBS 604, *Candida rugosa* CBS 613, *Candida sake* CBS 159, *Cryptococcus curvatus* NCAIM Y1210, *Cryptococcus laurentii* NCAIM Y1321, *Debaryomyces hansenii* NCAIM Y898, *Dekkera bruxellensis* NCAIM Y1007, *Geotrichum candidum* NCAIM Y274, *Kluyveromyces lactis* NCAIM Y0260, *Kluyveromyces marxianus* NCAIM Y1070, *Metschnikowia reukaufii* NCAIM Y1120, *Pichia carsonii* NCAIM Y968, *Pichia fermentans* NCAIM Y86^T, *Pichia kluyverii* NCAIM Y680, *Pichia membranifaciens* NCAIM Y1044^T, *Rhodotorula mucilaginosa* NCAIM Y212, *Saccharomyces exiguus* NCAIM Y1033^T, *Torulaspora delbrueckii* NCAIM Y982, *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y591, CBS 6124

A tejtermékekből származó izolátumok

Az élesztőizolátumok gyűjtése különböző gyártótól származó többféle tejterméktípusból, így tehéntúróból, különböző, tehéntejből készült sajtokból, kecsketejből készült sajtból, Túró Rudiból történt.

Csirkehúsból származó izolátumok

A tejtermékekből gyűjtött izolátumokkal összehasonlított, csirkehúsból származó élesztőtörzseket (Y01481, Y01482, Y01483, Y01484, Y01485, Y01486, Y01487, Y01488, Y01489) Ismail és társai (2000) izolálták.

Sajtminták elkészítése a táptalajösszehasonlításhoz

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 cm³ 0,1%-os peptonvízben homogéneztem Stomacher készülék (Bagmixer^R 400, Interscience) segítségével. Ezután két párhuzamosban tízes alapú hígítási sort készítettem a hatodik hígítási tagig.

Táptalajok

A kereskedelmi forgalomban is kapható táptalajokat a gyártó útmutatásai alapján készítettem el.

(1) Bengál rózsa kloramfenikol agar (RBC; Merck), (2) Diklorán bengál rózsa kloramfenikol agar (DRBC; Merck), (3) Diklorán 18%-os glicerol agar (DG18) alap-agar porból (Merck) kloramfenikol (100 mg l⁻¹) hozzáadásával elkészítve (Sigma-Aldrich). Malt extract agar (Merck) felhasználásával készült három táptalaj, így a (4) Nátrium-kloriddal (40 g l⁻¹) kiegészített maláta kivonat agar (MES) oxitetraciklin hozzáadásával (100 mg l⁻¹; Fluka), a (5) Bifenillel kiegészített maláta kivonat agar (MEP), 0,05% (w/v) bifenillel (Fluka), a (6) Maláta kivonat agar ökor epével kiegészítve (MEO) 0,2% (w/v) ökörepével (Fluka). (7) Az Oxitetraciklin gentamicin glükóz élesztőkivonat agar (OGGY) OGY agar (Merck) filter sterilizált oxitetraciklinnel (100 mg l⁻¹, Fluka) és gentamicin-szulfáttal (50 mg l⁻¹; Fluka) kiegészítve. (8) Molibdát agar (MOL) Maclaren and Armen (1958) szerint elkészítve. (9) Molibdénsav agar kalcium-propionáttal kiegészítve (MOPR) MOL-ból elkészítve 1,25 ml 10%-os (w/v) kalcium-propionát (Fluka) oldat hozzáadásával. (10) Élesztőkivonat glükóz kloramfenikol agar oligomicinnel (YGCO) YGC alapporból elkészítve (Merck), a megszilárdult lemezek felületét 0,1-0,1 cm³ filter sterilizált oligomicin oldattal kezelve (100 mg l⁻¹, Fluka). (11) Élesztőkivonat agar eugenollal kiegészítve (YEE) élesztőkivonat agarból (Merck) elkészítve eugenollal 200 µg cm⁻³ végkoncentrációig kiegészítve.

Telepszámlálás

Minden táptalajból tizenhét lemezt készítettem (három almintából két párhuzamost) a három legnagyobb hígítási fokokból (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶) úgy, hogy 0,1 cm³ mennyiséget szélesztettem a telepek felszínén. A lemezeket 25°C-on öt napig tartó inkubálás után értékeltem. A telepeket morfológiájuk alapján különböztettem meg és a baktériumokat, penészeket, valamint az élesztőket külön számláltam meg.

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).

Élesztőtörzsek izolálása

Az élesztőtörzsek szelektív izolálását diklorán bengál rózsa (DRBC) táptalajon végeztem.

Egyszerűsített identifikációs rendszer

A tejtermékekből származó élesztőtörzsek hagyományos módszereken alapuló identifikálását Deák és Beuchat (1993) által kifejlesztett egyszerűsített identifikációs eljárás alapján (Simplified Identification Method, SIM) végeztem. A módszer alkalmazásakor az izolátumok hat próba, az ureáz próba, a nitrát- és eritrit asszimiláció, a cikloheximid-rezisztencia és a cellobióz- és mannit asszimiláció alapján sorolhatók főbb csoportokba, majd a meghatározást a csoportokon belül további próbák alapján végezzük a SIM rendszer 120, élelmiszerekben leggyakrabban előforduló élesztőfajt tartalmazó adatbázisán belül.

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 előkezelttem 10 percig 10 mM Tris-HCl-t (tris[hidroximetil]aminometán hidroklorid) (Sigma), 5 mM EDTA-t (selecton B2)(Reanal) és 5 mM DTT-t (ditiotreitól)(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. 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. 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. A megszilárdult 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 0,5 mM-os 9,0 pH-jú EDTA oldatban történt.

DNS izolálása

A DNS izolálása Hoffman és Winston (1987) módszerének módosított változata szerint történt.

Kariotipizálás

Az élesztőkromoszómákat tartalmazó agaróz blokkokat 0,9 %-os agaróz gélbe (Promega) ágyaztam, majd a kromoszómákat CHEF II (Bio-Rad) pulzáló mezejű rendszerrel elektroforetikus 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 µl mL⁻¹) kezeltem, majd desztillált vízben mostam. A gél ezután 302 nm-en UV fényrel megvilágítva Gél Doc 1000 digitális kamerával (Bio-Rad) fényképeztem.

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 (5'GTAGGTAGTCATATGCTTGTCTC3') és ITS2 (5'GCTGCGTTCATCGATC3') primereket (Bio-Science) használtam (Dlauchy et al, 1999). A megsokszorozást Hybaid 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.

Az amplikonok enzimes hasításának a paraméterei

A polimeráz láncreakció (PCR) segítségével megsokszorozott amplikonok feldarabolásához *Hae III* és *Msp I* restriktions endonukleázokat (Promega) használtam.

A Random Amplified Polymorphism DNA-PCR (RAPD-PCR) és a microsatellite-PCR paraméterei

A DNS amplifikálása, amelyhez OPE 16 (5'GGTGACTGTG3') random-, és M13 (5'GAGGGTGGCGTTCT3') microsatellite primert használtam, Hybaid Sprint típusú PCR készülék segítségével történt a következő

paraméterekkel: 94 °C-on 4 percig tartott a bevezető egyszálúsítási szakasz, amelyet 35-ször ismétlődő 94 °C-on 30 percig tartó egyszálúsítási, 36 °C-on történő primer kötődési és egy 72 °C-on 45 percig tartó primer hosszabbodási szakaszból álló ciklus követett. Végül a DNS megsokszorozását egy 72 °C-on 7 percig tartó végső lánchosszabbítás zárja.

Gélelektroforézis és géliértékelés

Mind a ribotipizálás során kapott fragmentek, mind a RAPD és a microsatellite-PCR analízis során kapott amplikonok gélelektroforézise 1.2 % -os agaróz gélben (Promega) történt, horizontális futtatókérdő (Promega) segítségével. Futtatás után a géleket etidium-bromiddal megfestettem, UV fényrel megvilágítottam és a kapott gélképeket GelDoc 2000 System (Biorad) segítségével számítógépesen rögzítettem. A gélmintázatok alapján a Molecular Analyst programmal, UPGMA módszerrel dendrogramot készítettem.

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. Az izolátumok szénforrás hasznosításának vizsgálata folyékony táplevesben, 25°C-ra rázógépből (30 rpm) rázatva történt. A nitrogénforrás vizsgálatát auxanográfias módszer szerint végeztük szilárd tápagon egy héten át. Az urea bontás vizsgálatához Bacto Urea Broth (Difco) táplevest használtunk, és a *Y. lipolytica* típusörzs szolgált pozitív kontrollként. Az izolátumok zsírbontó képességének a vizsgálata Marquina és munkatársai (1992) leírása alapján történt.

Az előzőekben leírt módon megsokszorozott 18S rDNS és az azzal határos ITS1 részek feldarabolásához *Alu I*, *Hae III*, *Msp I*, *Not I* és *Sfi I* restriktions endonukleázokat (Promega) használtam.

A 26S rDNS, a vele szomszédos ITS2 szakasz és az 5,8 rDNS megsokszorozásához az ITS3 (5'GCATCGATGAAGAACGCAGC3') (White et al, 1990) és az LR5 (5'ATCCTGAGGGAAACTT3') (Vilgalys and Hester, 1990) primert használtuk. A vizsgált törzsek és a *Yarrowia lipolytica* típusörzs 26S rDNS - ének D1/D2 doménjének szekvenálása Kurtzman és Robnett (1998) leírása szerint történt. A Y.01482 és a Y.1486 jelű izolátumok 26S rDNS-ének D1/D2 régiójának szekvenciája a GenBank adatbázisban lett beillesztve a BLAST 2.2.2 adatbázis kereső program segítségével (Altschul et al, 1997).

3. Összefoglalás

Táptalajok összehasonlítása élesztők tejtermékekből történő izolálására való alkalmasságuk szempontjából

Az 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 következőleg 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 (Beuchat, 1993; Deák és Beuchat, 1996).

A tejtermékekből származó izolátumok azonosítása hagyományos módon

A tejtermékekből származó élesztőizolátumok nagyon változatosak voltak. A különböző tejtermékfélékből gyűjtött 64 izolátum, amelyeket az egyszerűsített identifikációs rendszer segítségével azonosítottam, 27 fajba volt sorolható. A legtöbbször előforduló izolátumok a *Debaryomyces hansenii*, a *Geotrichum candidum*, és a *Yarrowia lipolytica* élesztőfajba tartoztak.

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 *Khuyveromyces 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* (teleomorfi: *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 *Torulaspota 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.

A *Geotrichum candidum* élesztőtörzsek kariotipizálása

A tejtermékekből származó *Geotrichum candidum* élesztőizolátumok pulzáló gélelektroforézissel (PFGE) szétválasztott kromoszómáinak a száma 3 és 6 között változott. Az egyes élesztőtörzsek kariogramjuk alapján megkülönböztethetők voltak egymástól, csupán két törzs kromoszóma-ujjlenyomata bizonyult egyformának. A módszer hátránya a nagy időigénye volt.

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* restriktív enzimekkel hasítása az élesztőizolátumok faji szinten történő azonosítására

alkalmas módszernek bizonyult. Valamennyi referenciatörzs esetén jól értékelhető restriktív 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 Dlačny 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.

A leggyakoribb élesztőfajok törzseinek megkülönböztetése RAPD-PCR és microsatellite-PCR módszerekkel

Az azonos fajokba tartozó izolátumok további vizsgálatához a Random Amplified Polymorphic (RAPD)-PCR és microsatellite-PCR analízist alkalmaztam, OPE 16 random és M 13 microsatellite primer felhasználásával és segítségével a *Geotrichum candidum*, a *Debaryomyces hansenii* és a *Yarrowia lipolytica* élesztőfajok törzseit megfelelő mértékben meg tudtam különböztetni egymástól. 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 ujjlenyomatának 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 volt, 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.

A tejtermékekből származó *Yarrowia lipolytica* izolátumok összehasonlítása baromfihúsból származó izolátumokkal

A tejtermékekben legtöbbször előforduló három élesztőfaj közül a *Yarrowia lipolytica*-ként azonosított izolátumokat más élelmiszer-típusból (csirkehúsból) származó izolátumokkal hasonlítottam össze először a molekuláris módszerek közül a 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 élelmiszer-típus, amelyben a *Yarrowia lipolytica* gyakran előfordul.

A 18S rDNS NS1 és ITS 2 primerekkel nyert PCR-fragmentek *Hae III* enzimes hasításával kapott ujjlenyomatokat összehasonlítva a kilenc baromfihúsból származó élesztőtörzsből hat törzs egymással azonos, de a *Yarrowia lipolytica* típus-törzsétől nagymértékben eltérő ujjlenyomatot adott. A fiziológiai tulajdonságaikat összehasonlítva a leghatározottabb különbség, amely a *Yarrowia lipolytica* CBS 6124 jelű törzs (Barnett et al, 2000; Kurtzman, 1998) és a hat, élesztőtörzs között az volt, hogy a *Yarrowia lipolytica*-val ellentétben az utóbbiak az N-acetil-D-glükózamint 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 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* típus-törzs 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* típus-törzstől, 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* típus-törzsétől különböző. A Y.01482 és a Y.1486 26S rDNS-ének D1/D2 régiójának szekvenciája a GenBank adatbázisban lett elhelyezve.

4. Következtetések

A szelektív táptalajok összehasonlítása során kapott eredmények szerint az élesztőgombák különböző élelmiszer-típusból történő izolálására használt 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.

A hazai tejtermékekből gyűjtött és az egyszerűsített identifikációs rendszer (SIM; Deák és Beuchat, 1993) segítségével meghatározott izolátumok összesen 27 élesztőfajba tartoztak, melyek közül az izolátumok száma szerint meghatározott sorban 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 izolátumok meghatározása az egyszerűsített identifikációs rendszer segítségével a hagyományos meghatározáshoz képest viszonylag rövid idő, kb. hét nap alatt történt, tehát ez a módszer alkalmasnak tekinthető a tejtermékekből izolált élesztők gyors meghatározására.

Az egyik, tejtermékekben leggyakrabban előforduló élesztőfaj, a *Geotrichum candidum* 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 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 gyors módszerek közé nem sorolható.

A polimeráz láncreakció segítségével megsokszorozott 18S rDNS és a vele szomszédos ITS1 régió restriktív enzimekkel történő hasítását az élesztőizolátumok faji szinten történő azonosítására találtam alkalmasnak. Mivel a kapott eredmények alapján 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 azonosítására alkalmas lehet, szemben a hosszadalmas tenyésztéses eljárásokkal.

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

Hazai tejtermékekben az egyik leggyakoribb élesztőfajnak, a *Yarrowia lipolytica*-nak a törzseit egy másik élelmiszertípusból (baromfihúsból) származó izolátumokkal hasonlítottam össze molekuláris vizsgálatokkal. Ehhez először a ribotipizálást alkalmaztam. A kilenc, baromfihúsból származó izolátum közül 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 eltérő törzs közül háromnak és a *Yarrowia lipolytica* NCAIM Y00591 típus törzsnek 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).

5. A vizsgálatok jelentősége

Hazai tejtermékek körében ilyen részletes, molekuláris mélységű vizsgálatokra korábban nem került sor. Eredményeim igazolták, hogy az élesztőgombák a hazai tejtermékek mikrobiótájában 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 élesztőbiótájának összetételéről kapott adatok, a tejtermékekből származó izolátumok faji- és törzsi szintű azonosítására ajánlott hagyományos és molekuláris módszerek nemcsak az alap kutatásban, hanem a tejpari minőség-ellenőrzés során is hasznosíthatóak lehetnek a jövőben.

6. Irodalomjegyzék

Altschul, S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller, W. and Lipman D.J. (1997): Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, pp. 3389-3401

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

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

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

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

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

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

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

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. *J. of Food Protection* **50**, pp. 585-592

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

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

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

- Dlauchy, D., Tornai-Lehoczki, j. and Péter, G.** (1999): Restriktion enzyme analysis of PCR amplified rDNA as taxonomic tool in the yeast identification. *System. and Applied Microbiology* **22**, pp. 445-435
- 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
- Fleet, G.H.** (1990): Food spoilage yeasts. In: *Yeast Technology* (Spencer, J.F.T.-Spencer, D.M., eds.). Springer Verlag, Berlin pp. 124-166
- 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
- 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
- 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
- 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* 4th ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 420-421
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J.** (1998): Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts from Anallysis of Nuclear Large Subunit (26 S) Ribosomal DNA Partial Sequences. *Antonie van Leewenhoek* **73**, pp. 331-371
- Maclaren, J.A. and Armen, D.** (1958): Pigmentation of *Candida albicans* by molybdenum. *Am. J. Clin. Pathol.*, **30**, pp. 411-421
- 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
- 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
- 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
- Petersen, K.M. and Moller, P.L.** (2001): DNA typing methods for differentiation of *Deb. hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *Int. J. of Food Microbiology* **69**, pp. 11-24
- Péter, G., Dlauchy, D., Vasdinyei, R., Tornai-Lehocki, J. and Deák, T.** (2004): *Candida galli* sp. nov., a new yeast from poultry. *Antonie van Leeuwenhoek* **85**, pp. 105-110
- 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., 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

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

Tempel, T. and Jakobsen (1998): Yeasts associated with Danablu. *Int. Dairy Journal* **8**, pp. 25-31

Tornai-Lehoczki, J. and Dlačny, 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

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

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

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

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^{ed}. Elsevier Science Publ., Amsterdam, pp. 77-100

7. Publikációk

Szakcikkek

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-Lehoczki, 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

Előadások, poszterek

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 occurring in Hungarian dairy products. „Power of Microbes in Industry and Environment”, Croatian, Hungarian and Slovenian Symposium on Industrial Microbiology and Microbial Ecology, Opatija, Croatia. Abstr. pp.: 48

Vasdinyei, R. and Deák, T. (2002): Yeasts occurring in Hungarian dairy products. Food Micro 2002, „Friends and Foes”, 18th Symposium of the International Committee 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 occurring in Hungarian dairy products. Food Microbiology Symposium and Rapid Methods Workshop, River Falls, USA

Vasdinyei, R. és Deák, T. (2002): Tejtermékek élesztőizolatúmainak 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. 23rd 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. 23rd 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. 14th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Balatonfüred, Hungary. Abstr. pp.: 169

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*. 23rd International Specialised Symposium on Yeasts, Budapest, Hungary. Abstr. pp.: 50

