

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**ÚJ TECHNOLÓGIAI LEHETŐSÉGEK
ALKOHOLSZEGÉNY SÖRÖK ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

FARKAS GABRIELLA

BUDAPEST, 2007

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter, DSc
egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: Dr. Hoschke Ágoston
egyetemi tanár
Sör- és Szeszipari Tanszék
Élelmiszertudományi Kar
Budapesti Corvinus Egyetem

A doktori iskola- és a 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 védési eljárásra bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	6
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1	A sörélesztő jellemzése	8
2.1.1	Rendszertani besorolás	8
2.1.2	Tápanyagszükséglet.....	9
2.1.3	Anyagcsere	10
2.2	Killer élesztők jellemzése, létrehozása és alkalmazása.....	13
2.2.1	A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> killer rendszere.....	14
2.2.1.1	Az L-A mikovírus	14
2.2.1.2	A szatellit M-dsRNS	14
2.2.1.3	A K1, K2 és K28 toxinok.....	15
2.2.1.4	A K1, K2 és K28 toxinok hatásmechanizmusa	15
2.2.1.5	Immunitás	16
2.2.2	Killer rendszerek egyéb élesztő nemzetségeiben.....	17
2.2.2.1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	18
2.2.2.2	<i>Hanseniaspora uvarum</i> és <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	18
2.2.3	Killer élesztők alkalmazása	18
2.2.3.1	Borászat.....	19
2.2.3.2	Sütőipar	19
2.2.3.3	Élelmiszeripari vonatkozású ozmofil és halofil killer élesztők	20
2.2.4	Killer élesztők létrehozása.....	20
2.2.4.1	Killer sörélesztők létrehozása rare-mating módszerrel	21
2.2.4.2	Killer sörélesztők létrehozása protoplaszt fúzióval.....	22
2.2.5	Killer sörélesztők erjesztő képességének vizsgálata.....	23
2.3	Kölcsönhatások a mikroorganizmusok között.....	26
2.3.1	Kölcsönhatások osztályozása.....	26
2.3.1.1	Főbb kölcsönhatások.....	27
2.4	Kevert mikroba kultúrák az élelmiszerekben.....	29
2.4.1	A bor.....	29
2.4.2	A sör	30
2.4.2.1	A lambic és gueze sörök erjesztésének jellemzése.....	30
2.5	Sejtek rögzítése és a rögzítés fiziológiai hatása. Rögzített sejtek ipari alkalmazásai.....	32
2.5.1	Sejtrögzítési technikák.....	33
2.5.1.1	Sejtrögzítés hordozó nélkül.....	33
2.5.1.2	Keresztkötés	34
2.5.1.3	Kovalens kötés	34
2.5.1.4	Adszorpció	34
2.5.1.5	Gélbezárás	34
2.5.1.6	Folyékony membránba bezárás.....	35
2.5.1.7	Komplex rögzítési eljárások.....	35
2.5.2	A hordozóval szembeni elvárások	36
2.5.3	Az immobilizálás előnyei és hátrányai	36
2.5.4	A rögzített sejtek fiziológiája.....	37
2.5.4.1	Sejtszaporodás.....	38
2.5.4.2	Anyagcsere-termékek képződése	39
2.5.4.3	Sejtösszetétel (DNS-, RNS- és fehérjetartalom, tartalék szénhidrátok)	41
2.5.5	A sejtrögzítés söripari vonatkozásai	42
2.5.5.1	Folyamatos főerjesztés és ászokolás	43
2.5.5.2	Alkoholmentes sör gyártása	45
3	KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉS	48

4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	49
4.1	Felhasznált anyagok.....	49
4.1.1	Élesztőtörzsek.....	49
4.1.2	Táptalajok.....	50
4.1.3	Killer sörlesztő létrehozása.....	51
4.1.4	Maláták.....	52
4.2	Élesztőtörzsek fenntartása és szaporítása.....	52
4.3	Élesztőtörzsek szelektálása a protoplaszt fúzióhoz.....	52
4.3.1	Szénhidrát fermentációs teszt.....	52
4.3.2	Szaporodóképesség vizsgálat 4°C-on.....	53
4.3.3	Agar diffúziós módszer killer toxin termelés kimutatására.....	53
4.4	Killer élesztők létrehozása és vizsgálata.....	53
4.4.1	Protoplaszt fúzió.....	53
4.4.2	Kariotipizálás pulzáló gélelektroforézissel.....	54
4.4.3	dsRNS plazmid izolálása killer élesztőből.....	54
4.5	Kevert kultúras erjesztésekkel és kölcsönhatások vizsgálatával kapcsolatos módszerek.....	55
4.5.1	Sörlesztő és idegen élesztő törzsek arányának meghatározása morfológia alapján.....	55
4.5.2	Lizin agar <i>Saccharomyces</i> és nem- <i>Saccharomyces</i> élesztőtörzs megkülönböztetésére.....	55
4.5.3	Kevert kultúras erjesztések.....	56
4.5.4	Két élesztőtörzs kölcsönhatásának vizsgálata.....	56
4.6	Alkoholszegény sörök előállításának modellezéséhez alkalmazott módszerek.....	57
4.6.1	Sörlé előállítás laboratóriumi körülmények között.....	57
4.6.2	Végerjedésszint meghatározása.....	58
4.6.3	Erjesztés laboratóriumi körülmények között.....	58
4.6.4	Élesztősejtek rögzítése.....	58
4.7	Analitikai módszerek.....	58
4.7.1	Aromakomponensek meghatározása gázkromatográffal.....	58
4.7.2	Szénhidrátartalom meghatározása HPLC-vel.....	59
4.7.3	A sör paramétereinek meghatározása.....	59
5	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	60
5.1	Killer sörlesztő létrehozása és vizsgálata.....	60
5.1.1	Sörlesztő törzsek szelektálása.....	61
5.1.2	Killer sörlesztők létrehozása protoplaszt fúzióval.....	62
5.1.2.1	dsRNS plazmid izolálása killer élesztőből.....	63
5.1.2.2	Kariotipizálás pulzáló gélelektroforézissel.....	64
5.1.3	A protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörlesztő killer aktivitásának vizsgálata.....	65
5.1.3.1	Toxintermelés különböző hőmérsékleteken.....	65
5.1.3.2	Kevert kultúras toxinvizsgálatok.....	66
5.1.3.3	A dsRNS jelenlétének kimutatása.....	67
5.2	Kevert kultúras erjesztések sörlesztővel és idegen élesztőkkel.....	69
5.2.1	Élesztőtörzsek szelekciója.....	70
5.2.2	Kevert kultúras erjesztések.....	71
5.2.2.1	I. erjesztési kísérlet. Monokultúras erjesztés.....	71
5.2.2.2	II.a erjesztési kísérlet. Kevert kultúras főerjesztés.....	73
5.2.2.3	II.b erjesztési kísérlet. Kevert kultúras utóerjesztés.....	76
5.2.2.4	III. erjesztési kísérlet. Kevert kultúras erjesztés megnövelt idegen élesztő aránnyal.....	81
5.2.2.5	IV. erjesztési kísérlet. Kevert kultúras erjesztés <i>Saccharomyces cerevisiae</i> WS 34/70 sörlesztővel és <i>Saccharomyces ludwigii</i> élesztővel.....	85
5.3	Élesztő törzsek közötti kölcsönhatás vizsgálata.....	87
5.3.1	A <i>Saccharomyces ludwigii</i> élesztő killer aktivitásának vizsgálata.....	88

5.3.2	A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> WS 34/70 sörlesztő és a <i>Saccharomyces ludwigii</i> élesztő kölcsönhatásának vizsgálata kevert kultúras erjesztésekkel	89
5.3.2.1	Kölcsönhatás vizsgálat 8°C-on. I. erjesztési kísérlet.....	90
5.3.2.2	Kölcsönhatás vizsgálat 8°C-on. II. erjesztési kísérlet	91
5.3.2.3	Kölcsönhatás vizsgálat 20°C-on. I. erjesztési kísérlet.....	92
5.3.2.4	Kölcsönhatás vizsgálat 20°C-on. II. erjesztési kísérlet	94
5.3.3	A kölcsönhatás vizsgálatok eredményeinek összefoglalása és értékelése	95
5.4	Biotechnológiai módszerek alkalmazása alkoholszegény sörök előállítására.....	97
5.4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> WS 34/70 sörlesztőt és <i>Saccharomyces ludwigii</i> élesztőt tartalmazó keverék kultúra alkalmazása alkoholszegény sör előállítására	97
5.4.1.1	Kevert kultúras erjesztés <i>Saccharomyces cerevisiae</i> WS 34/70 sörlesztővel és <i>Saccharomyces ludwigii</i> élesztővel.....	97
5.4.1.2	Módosított szénhidrátartalmú sörlé előállítása laboratóriumi körülmények között	98
5.4.1.3	Sör készítése laboratóriumi körülmények között	102
5.4.2	Alkoholszegény sör előállítása folyamatos erjesztő rendszerben, rögzített hagyományos és killer sörlesztővel.....	104
5.4.2.1	Hagyományos és killer sörlesztő rögzítése.....	104
5.4.2.2	Folyamatos erjesztés rögzített hagyományos és killer sörlesztővel.....	105
6	ÖSSZEFOGLALÁS.....	111
7	SUMMARY	116
8	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	120
9	FELHASZNÁLT IRODALOM	121
10	MELLÉKLETEK.....	132

1 BEVEZETÉS

„A söriparban a kutatás és fejlesztés hangsúlya lényegesen eltér más iparágakétól.” – írta Dalglish 1972-ben. „Rendes körülmények között az ipari kutatás-fejlesztésnek az a célja, hogy a meglévő alapanyagokból új terméket hozzanak létre, és ezeknek a termékeknek általában rövid az élelciklusa. Ezzel szemben a sör olyan termék, aminek az élelciklusát évtizedekben vagy akár évszázadokban mérik, és a söripari kutatás-fejlesztés jelentős mértékben arra irányul, hogy alapvetően ugyanazt a terméket állítsák elő változó alapanyagokból. Ezért a kutatás-fejlesztési spektrum kutatás része a tényfeltárással összpontosít, míg a fejlesztés a folyamatok tökéletesítéséről és vizsgálatáról szól.” (MARÁZ et al. 1994)

Dalglish 1972-ben megfogalmazott gondolatai a mai napig érvényesek a söriparra. Az azóta elmúlt 34 év azonban elég hosszú idő ahhoz – még a sör élelciklusát figyelembe véve is –, hogy új termékek jelenjenek meg. Az elmúlt évtizedben Magyarországon is jelentős teret nyertek például az alkoholmentes és alkoholszegény sörök. Különböző technológiával, de minden hazai sörgyár előállít ilyen termékeket, a fogyasztók pedig kezdik elfogadni azokat. A sör piacának visszaszorulása miatt a csúcstechnológiával felszerelt üzemek kapacitásuk egy részét azonban nem tudják kihasználni. Ez talán jelzésként szolgálhatna a gyártóknak, hogy érdemes újszerű termék(ek) fejlesztésében gondolkodni a fogyasztók új csoportjának meghódítása érdekében. A termékfejlesztést – mint minden kutatást – alapkutatás kell, hogy megelőzze.

Sörgyártói körökben talán szokatlan gondolat a hagyományos sörélesztőn kívül más élesztőtörzset bevonni az erjesztésbe. Egy másik élesztő kevert kultúrában való alkalmazása újszerű ízekkel, aromákkal szolgálna. Megfelelő élesztőtörzs (maltóz negatív) használata pedig alkoholszegény terméket is eredményezhet. Kevert kultúra használatakor számolni kell a sejtek közötti kölcsönhatással, melynek természete akár a későbbi termék jellemzőire is hatással lehet. Ennek felderítése nélkül nem alkalmazható sikeresen több élesztő egyazon folyamatban. Munkám egyik célja volt egy vagy több olyan élesztőtörzs kiválasztása, melynek – a hagyományos sörélesztőtől eltérő – tulajdonságai révén szerepe lehet a jövőben egy újszerű termék kifejlesztésekor. Ehhez kapcsolódóan a hagyományos sörélesztő és a másik élesztő kölcsönhatásának feltérképezését is feladatommak tartottam.

Mindemellett – úgy vélem – a söripari folyamatok további fejlesztése is fontos. Az 1970-es évek óta az immobilizált élesztősejtek alkalmazásával számos kutatócsoport foglalkozik. A fejlesztések egy részének megvalósulása a söripari kutatók egyik legjelentősebb eredménye, ám korlátozott ipari felhasználásuk miatt a siker korán sem teljes. Munkámban genetikailag javított, killer tulajdonsággal rendelkező sörélesztőt hoztam létre protoplaszt fúzióval, majd rögzítve vizsgáltam és

használtam össze erjesztési képességeit hagyományos sörélesztővel. A genetikailag módosított élesztők – vagy bármilyen más söripari alapanyag – használatának gondolata nem népszerű a sörgyártók körében. Ám, ha ez az élesztő – az erjesztésen túl – további pozitív tulajdonságokat is hordoz, pl. védekezni tud a vadélesztőkkel szemben, akkor lehet létjogosultsága.

A sörgyártás az egyik olyan iparág, mely a tradíciókat rendkívül fontosnak tartja. A részleges megújulás azonban nem jelentene presztízs veszteséget, mert a megújulás maga a jövő.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A SÖRÉLESZTŐ JELLEMZÉSE

Kísérleti munkám állandó szereplője volt a *Saccharomyces cerevisiae* sörélesztő, melyet az alábbiakban szeretnék bemutatni.

2.1.1 Rendszertani besorolás

Emil Christian Hansen, dán fiziológus az ale sörélesztőt nevezte *Saccharomyces cerevisiae*-nek, míg a lager sörélesztő eltérő tulajdonságait azzal hangsúlyozta, hogy külön fajba helyezte el, amit *Saccharomyces carlsbergensis*-nek nevezett. *Kreger-van Rij* a sörélesztő fajokat 1984-ben egy fajba sorolta (*Saccharomyces cerevisiae*) (PRIEST&CAMPBELL 1996). A taxonómiai besorolás újabb változása révén a lager sörélesztőket 1990 óta a *Saccharomyces pastorianus* (szinonim *S. carlsbergensis*) fajba sorolják (DEÁK 1998).

Rendszertanilag a *S. cerevisiae* faj a *Saccharomyces* nemzetségbe, a *Saccharomycetaceae* családba, az *Endomycetales* rendbe, az *Ascomycetes* osztályba tartozik (DEÁK 1998).

A sörélesztő legfőbb feladata, hogy a sörlében található erjeszhető szénhidrátokat alkohollá és szén-dioxiddá fermentálja úgy, hogy eközben **megfelelő** mennyiségben képezzen olyan anyagcsere-termékeket (savakat, észtereket, kozmaolajokat, ketonokat), amelyek érzékszervi szempontból is kívánatosak a sörben. Erre nem minden élesztő képes, még ha a *S. cerevisiae* vagy *S. pastorianus* fajba is tartozik (ROSE&HARRISON 1970). Ezeken túl a sörélesztő alkalmasságának meghatározásában technológiai szempontból fontos tényező a flokkulációs képesség, amely genetikailag meghatározott. Csomósodó és porélesztőt különböztetünk meg. A csomósodó élesztők az erjedés vége előtt agglutinálódnak, míg a porélesztők hosszabb ideig finoman eloszolva lebegnek (NARZISS 1981).

A sörélesztők két csoportba sorolhatók az alapján, ahogy az erjesztés végén viselkednek. Az ún. **alsóerjesztésű sörélesztő** sejtjei a fermentáció befejeztével az erjesztőtank aljára ülepednek, gyűlnek össze. Ezek az élesztők a *S. carlsbergensis* fajba tartoznak, lager élesztőnek is nevezik őket és lager sörök (pl. pilzeni típusú, müncheni típusú) gyártásához használják a kontinentális Európában és a világ számos részén. Az alsóerjesztésű sörélesztők jellemzően flokkuláló (csomósodó) élesztők. A másik csoportba az ún. **felsőerjesztésű sörélesztők** tartoznak, amelynek sejtjei az erjedő sörlé felszínén gyűlnek össze, és köztük is előfordulnak flokkuláló élesztők. A *S. cerevisiae* fajba sorolják őket és az ale típusú sörök gyártásakor használják, jellemzően Nagy-Britanniában. Kivételt jelentenek a búzasörök, amikhez szintén felsőerjesztésű sörélesztőt

alkalmaznak a világ minden táján. Megjegyzendő azonban, hogy az ale és lager típusú sörök közötti eltérés nem kizárólag az élesztők különbségéből adódik, mert a többi alapanyag (maláta, komló, víz), illetve a technológia is eltérő (ROSE&HARRISON 1970).

A alsó- és felsőerjesztésű élesztők között további különbségek is tapasztalhatók. Az alsóerjesztésű élesztők 5-10°C-on erjesztenek, csökkent spóráképző képességűek. A felsőerjesztésűek 15-25°C-on erjesztenek, sarjadzanak és spóráznak (NARZISS 1981).

2.1.2 Tápanyagszükséglet

A sörélesztő egyszerű tápközegen is képes szaporodni, amely számára erjeszthető szénhidrátot, megfelelő nitrogénforrást, ásványi anyagokat és egy vagy több növekedési faktort tartalmaz. A sörlé – ha tisztán malátából készül – ideális tápközeg a sörélesztő számára, tartalmazza a növekedéséhez szükséges összes tápanyagot (PRIEST&CAMPBELL 1996).

Szénhidrát szükséglet A sörlében található szénhidrátok közül a sörélesztő számára a következők erjeszthetők: glükóz és fruktóz (monoszacharid), maltóz és szacharóz (diszacharid), valamint maltotrióz és raffinóz (triszacharid). A sörélesztő ezeken túl fel tudja használni a mannózt, a galaktózt és a pentózok közül a xilulózt is. A sörélesztőkre jellemző, hogy a laktózt nem erjesztik (NARZISS 1981, PRIEST&CAMPBELL 1996).

Nitrogén szükséglet A sörélesztő – mint minden más élesztő – számára az ammónium sók is megfelelő nitrogénforrásnak számítanak, ha a tápközeg egyéb szempontból megfelelő. Amennyiben a tápközeg sörlé, az élesztősejtek az abban található aminosavakat veszik fel és asszimilálják leggyorsabban, de a peptideket hasznosítására is képesek (ROSE&HARRISON 1970).

Ásványi anyag és tápanyag szükséglet A sörélesztő ásványi anyag szükséglete hasonló, mint minden más élő szervezeté: szüksége van káliumra, vasra, magnéziumra, mangánra, kalciumra, rézre és cinkre. További fontos ásványi anyagok a bór, a nikkel, a kobalt, és a molibdén. A sörélesztőnek szüksége van ún. növekedési faktor(ok)ra, amelyek közül a biotin elengedhetetlen. Az 1. táblázatban összefoglaltam azokat a vegyületeket, amelyek általában az élesztők számára növekedési faktornak számítanak, de amitől a sörélesztők igényei eltérhetnek (PRIEST&CAMPBELL 1996, ROSE&HARRISON 1970).

1.táblázat Sörélesztő törzsek növekedési faktor igénye

NÖVEKEDÉSI FAKTOR	IGÉNY
H-vitamin (biotin)	Szükséges.
pantotén sav	Szükséges.
inozít	Egyes sörélesztő törzseknek szükséges, másoknak nem.
B ₁ -vitamin (tiamin)	Felsőerjesztésű sörélesztők törzseknek szükséges, alsóerjesztésű sörélesztő törzseknek nem.
nikotin sav	Nem szükséges.
B ₆ -vitamin (piridoxin)	Nem szükséges.
B ₂ -vitamin (riboflavin)	Nem szükséges.
p-aminobenzoésav	Felsőerjesztésű sörélesztők törzseknek szükséges, alsóerjesztésű sörélesztő törzseknek nem.
folsav	Nem szükséges.
ergoszterin	Szigorúan anaerob körülmények között szükséges.

2.1.3 Anyagcsere

A sörlesztő anyagcsere folyamatai alapjaiban megegyeznek az egyéb élesztőfajokra jellemzőekkel. Itt csak azokat a folyamatokat kívánom kiemelni, amelyek a sörgyártás szempontjából valamely módon meghatározóak.

Szénhidrát-anyagcsere

Az élesztő a monoszacharidokat diffúzióval veszi fel, a szacharózt β -fruktofuranozidáz (invertáz) enzim bontja le a sejtfal közelében glükózzá és fruktózzá. A maltóznak és a maltotrióznak külön szállítórendszerei vannak a maltózpermeáz és maltotriózpermeáz révén. Ezek az enzimek csak akkor vannak jelen, ha az élesztő már adaptálódott a két szénhidráthoz – ha az élesztőt a főerjedés után azonnal újra felhasználják, vagy szaporítása sörlemben történt (NARZISS 1981).

A raffinóz esetében meg kell jegyezni, hogy azt teljesen (monoszacharidokra) csak az alsóerjesztésű élesztő képesek lebontani, mert rendelkeznek melibiáz enzimmal is a β -fruktofuranozidáz (invertáz) mellett. A felsőerjesztésűek a melibiózt nem bontják (1.ábra) (DEÁK 1998).



1.ábra. Alsó- és felsőerjesztésű sörlesztő raffinóz erjesztése (DEÁK 1998)

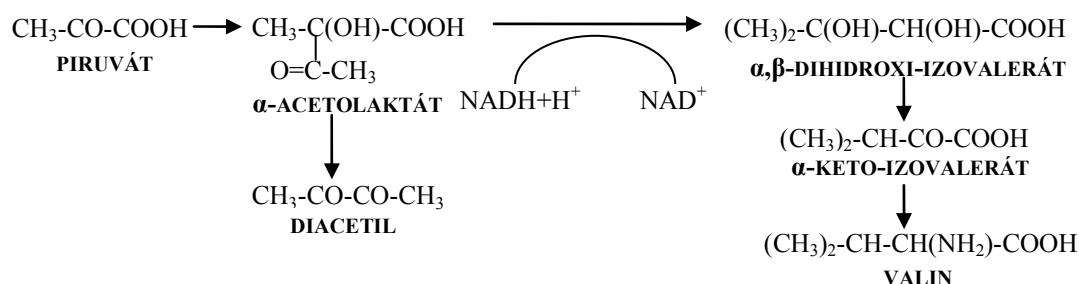
Nitrogén anyagcsere

A sörlesztő az aminosavakat meghatározott sorrendben veszi fel a sörlemből. A sörle elegendő aminosavat és peptidet kell hogy tartalmazzon ahhoz, hogy az élesztőszaporodást és az erjesztés lefolyását a kívánt értelemben lehetővé tegye (NARZISS 1981).

A sörle asszimilálható nitrogén tartalmához nagyobb mértékben járulnak hozzá az aminosavak, mint a polipeptidek, ezért a sörlevek szabad α -aminonitrogén (SZAN) tartalmát szokták megmérni. A sörle átlagos SZAN tartalma 100-140 mg/l. Ennél kisebb érték mellett a fermentáció lefolyása nem megfelelő (PRIEST&CAMPBELL 1996).

A végtermék minőségének szempontjából különösen fontos, hogy a sörle elegendő *valint* tartalmazzon. Amennyiben nincs elég valin a sörlemben, az élesztő saját maga szintetizálja. A szintézis egyik intermediér terméke az α -acetolaktát, amely kikerülve a sejtől oxidatív

dekarboxilezéssel *diacetillé* alakul (2. ábra). A diacetil ízlelési küszöbértéke rendkívül alacsony, 0,12-0,15 mg/l, íze pedig nagyon idegen a sör ízétől. A kész sör minőségét meghatározóan rontja, ha annyi keletkezik a fickósörben, hogy azt a sörélesztő nem tudja lebontani az érlelés folyamán.



2.ábra. A diacetil képződése

Lipid anyagcsere

Az élesztő lipidtartalma foszfolipidekből, trigliceridekből és szterinekből tevődik össze. Az élesztőlipidek a fehérjével együtt képezik az élesztő sejtmembránját. Tekintve, hogy a sejtmembrán szabályozza a tápanyagok sejtbe való beépítését és a kiválasztott anyagcseretermékek sejtből való kizárását, a lipidek tevékenysége alapvető fontosságú a sejtszaporodásnál.

Amennyiben nincs megfelelő mennyiségű molekuláris oxigén a sörlében, az élesztő szaporodása és viabilitása korlátozott lesz, mert a sejtek nem képesek telítetlen zsírsavakat előállítani a membrán bioszintéziséhez. Másodlagos hatása ennek ale sörélesztőknél az, hogy nagy mennyiségű észter lesz a késztermékben (PRIEST&CAMPBELL 1996).

Ásványi anyagok

Az sörélesztő optimális működéséhez (a szaporodásához és a fermentációhoz) szervesen ionok szükségesek, makromólos és mikromólos koncentrációban. Az élesztő-anyagcsere szempontjából nagy jelentőségűek a foszfátok (ATP, ADP). A kálium és a magnézium a szénhidrát-anyagcserében vesz részt. A vas és a réz kis mennyiségben is képesek fiziológiailag serkentően hatni. A cink elősegíti a fehérjeszintézist és a sejtszaporodást, illetve az alkohol-dehidrogenáz alkotórészeként jelentős hatást gyakorol a szénhidrátlebontás sebességére. (NARCISS 1981, HEGYESNÉ 2004)

A sör minősége szempontjából jelentős anyagcsere-termékek

Magasabb rendű alkoholok (kozmaolajok): aminosavakból képződnek, amelyek transzaminálással ketosavvá alakulnak, majd dekarboxilezéssel és redukcióval alkohollá. Emellett keletkezhetnek aminosavak intracelluláris szintézisével is.

Alifás alkoholok: n-propanol, n-butanol, izobutanol, optikailag aktív amil-alkohol (2-metil-butanol), izo-amilalkohol (3-metil-butanol).

Észterek: a söraroma fő hordozói. Intracellulárisan az acetyl-Co-A vegyületek és az alkoholok kondenzációjával képződnek. Képződésük összefügg az élesztő növekedésével, és a zsírsavak is hatást gyakorolnak szintézisükre. A sör főbb észterei az etil-acetát és az izo-amilacetát.

Acetaldehid: a főerjedés első 48 órájában képződik piruváttól, és a fickósör jellegzetes ízét adja. Képződését elősegíti a nagy élesztőadag, a magas erjesztési hőmérséklet és a kevés levegőztetés. A fő- és utóerjedés során mennyisége fokozatosan csökken (NARZISS 1981).

CAMPBELL (2000) a sörélesztő legfontosabb tulajdonságait az alábbiakban állapította meg:

- egyenletes íz- és aromaanyag termelés,
- gyors erjesztés,
- hatékony fermentáció (maximális etanol hozam, minimális biomassza képződés),
- a kezdeti szénhidráttartalom okozta ozmotikus stressz, végső alkohol- és szén-dioxid-tartalom toxikus hatásával szembeni rezisztencia,
- alkohol és szénhidrát tolerancia,
- megfelelő flokkulációs és ülepedési tulajdonságok a fermentáció végén,
- nagy arányú viabilitás a fermentáció befejeztével, mely lehetővé teszi a felhasználást további erjesztésekhez,
- genetikai stabilitás.

2.2 KILLER ÉLESZTŐK JELLEMZÉSE, LÉTREHOZÁSA ÉS ALKALMAZÁSA

A killer fenotípus felfedezéséről *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben Bevan és Makower számolt be először 1963-ban a XI. Nemzetközi Genetikai Konferencián (SCHMITT&BREINIG 2002). Azóta is számtalan vizsgálat foglalkozik a killer jelenséggel, bemutatva, hogy az meglehetősen gyakori a természetben és az élesztők számos nemzetségénél előfordul (BUZZINI et al. 2004, CHEN et al. 2000, MIDDELBECK et al. 1980, MITCHELL&BEVAN 1983, YOUNG&YAGIU 1978). Killer élesztőket több természetes előfordulási helyről izoláltak, pl. gyümölcsökből, ehető gombából, rothadó növényekből és talajból, valamint sör és bor fermentációja során (WALKER et al. 1995).

A killer élesztők exotoxint termelnek, ami elpusztítja az azonos vagy közeli nemzetségbe tartozó érzékeny élesztősejteket, a saját killer toxinjuk tevékenységére azonban nem fogékonyak (MAGLIANI et al. 1997). Noha a jelenség egy rövid mondatban összefoglalható, a háttérben található rendszer igen összetett, bonyolult és korántsem tekinthető teljes mértékben felfedezettnek és megismertnek. Például, arra az alapvetőnek tűnő kérdésre, hogy miért nem érzékenyek a killer élesztők saját toxinjukra, a mai napig keresik a választ, folynak a vizsgálatok (BREINIG et al. 2006).

A killer jelenséget egy citoplazmában öröklődő kettős-szálú RNS (továbbiakban dsRNS) vírus jelenléte okozza. Az élesztősejtek tartós fertőzöttsége tüneteket nem okoz, és nem jelent hátrányt az egyes sejteknek sem.

Talán a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő killer rendszerét tárták fel a legmélyebben az összes ismert élesztő-dsRNS vírus rendszer között (MITCHELL&BEVAN 1983). YOUNG és YAGIU 1978-ban azt írta, hogy három különböző killer csoport (rendszer) található a *Saccharomyces* nemzetségben belül, majd később már öt killer toxinról szólnak a cikkek: K1, K2, K3, KT28 (K28 jelölés is elterjedt) és K3GR1 (EXTREMERA et al. 1982, VAGNOLI et al. 1993). A publikált cikkekből azonban az is egyértelmű, hogy a mai napig csak a K1, K2 és KT28 toxin termelődésének molekuláris háttérét és hatásának mechanizmusát tárták fel (MAGLIANI et al. 1997, SCHMITT&BREINIG 2002, SCHMITT&TIPPER 1990). A K3 toxin hatásmechanizmusa nem pontosan ismert (NOVOTNÁ et al. 2004), és többen is utalnak rá, hogy nem különíthető el tisztán a K2 toxintól, és feltételezhető, hogy az M3-dsRNS csak egy mutációja az M2-dsRNS-nek (MUSMANNO et al. 1999, VAGNOLI et al. 1993).

2.2.1 *A Saccharomyces cerevisiae* killer rendszere

A toxintermelő *Saccharomyces cerevisiae* killer törzseket három nagy csoportra lehet osztani – K1, K2 és K28 –, amelyek mindegyike egy sajátos killer toxint választ ki. A toxin termeléséért egy citoplazmában öröklődő M-dsRNS szatellit vírus felelős (ezeket ScV-M1, ScV-M2 és ScV-M28 jelöléssel illetik), amelynek stabil fennmaradása és replikálódása a fertőzött gazdasejt citoplazmáján belül egy L-A segítő vírus jelenlététől függ. Azok a sejtek, amelyek nem tartalmazzák egyik dsRNS-t sem, vagy csak L-A segítő vírust hordoznak, érzékenyek a toxinra és nem killerek. Míg a ScV-M1, ScV-M2 vagy ScV-M28 vírust hordozók killerek és nem érzékenyek a toxinra (SCHMITT&BREINIG 2002). A három fajta killer toxint kódoló három dsRNS mérete is különböző: ScV-M1 – 1,8 kilobázis, ScV-M2 – 1,5 kb és a ScV-M28 – 1,9 kb, ezek hasonló szervezetséget mutatnak, még ha jelentősebb szekvencia homológia nincs is közöttük (MAGLIANI et al. 1997).

2.2.1.1 Az L-A mikovírus

Az L-A vírus egy önálló replikálódásra képes mikovírus, ami nem eredményez észlelhető fenotípust a gazda sejtben, és nem szükséges az M-dsRNS szatellit vírus jelenléte ahhoz, hogy fennmaradjon vagy replikálódjon. Az L-A vírus a Totiviridae víruscsaládhoz tartozik (SCHMITT&BREINIG 2002). A vírus egy 39 nanométer átmérőjű, burok nélküli izometrikus részecske, amely egy osztatlan kettős szálú RNS-t tartalmaz (MAGLIANI et al. 1997). Az érett L-A vírus részecskében a dsRNS mérete 4,6 kilobázis, amely egy nagyobb burokfehérjét, és egy RNS függő RNS polimeráz enzimet kódol.

Az L-A mikovírusok segíteni tudják a számos szatellit M-dsRNS egyikének replikálását és burokba záródását, amelyek mindegyike egy killer-immun rendszert kódol. Az M szatellit genom és az L-A kölcsönhatásának vizsgálata révén lehetett azonosítani négy természetes változatát az L-A dsRNS-nek (L-A-H, L-A-E, L-A-HN és L-A-HNB).

2.2.1.2 A szatellit M-dsRNS

A szatellit M-dsRNS-ek az RNS molekulák egy családja, ami a vírusszerű részecskében van jelen, tartósan megmaradva a *Saccharomyces cerevisiae* killer törzsek citoplazmájában. Az M-dsRNS fenntartása az L-A mindkét ORF-jének (ORF: nyitott leolvasási keret) kifejeződésétől függ. Megfigyelték, hogy lényegében minden L-A variáns és M-dsRNS egymással felcserélhető. Ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy az L-A-HN megtalálható minden K1, illetve az L-A-H minden K2 vad típusú killer törzsből. A genotípustól függetlenül, az ScV-M1 kirekeszti, kiűzi az ScV-M2-től bármely killer törzsből. Az M-dsRNS mérete kevesebb, mint fele az L-A dsRNS méretének, és egy L-A által kódolt burokba van csomagolva (MAGLIANI et al. 1997).

2.2.1.3 A K1, K2 és K28 toxinok

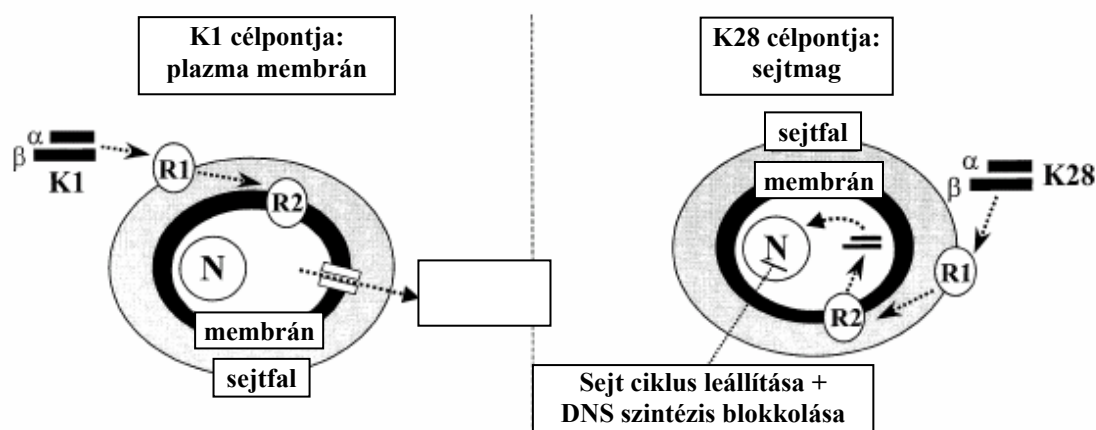
A K1, K2 és K28 *Saccharomyces cerevisiae* killer toxinok fehérje molekulák, amiket specifikus szatellit dsRNS-t hordozó killer törzsek választanak ki. A killer törzsek immúnisak saját toxinjukkal szemben, de más killer toxinra érzékenyek lehetnek.

A legtöbbet tanulmányozott és legjobban ismert killer toxin a K1-es, mérete 19 kDa. A toxin molekula két nem-glikolizált alegységből áll, amit diszulfid-híd köt össze. Az α alegység 9,5 kDa-os, míg a β alegység 9,0 kDa-os, amelyek egy 42 kDa-os glikolizált prekursor molekulából, a protoxinból származnak. Az M1-dsRNS elsődleges transzlációs terméke egy 35 kDa-os, 316 aminosavból álló polipeptid (preprotoxin).

A K2 és K28 toxinokat kevésbé behatóan tanulmányozták, mint a K1 toxint, de alapvető sajátosságaik ismertek. A K2 toxin prekuzora egy 38,7 kDa nagyságú 362 aminosavból álló molekula. A végső α és β alegységek nagyobbak, mint a K1 toxin esetében. A K28 toxin preprotoxinja 345 aminosavból épül fel, mérete 37,6 kDa. Az élesztősejtben lejátszódó átalakulások után szintén egy dimer molekula választódik ki a sejtéből, amiben az α alegységet (10,5 kDa) és a β alegységet (11 kDa) szintén diszulfid-híd köti össze.

2.2.1.4 A K1, K2 és K28 toxinok hatásmechanizmusa

Minden kiválasztott érett toxin képes killer tevékenységre érzékeny sejteken, különböző mechanizmussal (3. ábra), ami specifikus elsődleges kötéssel kapcsolódik egy a sejt falban található receptorhoz. A toxinok hatásmechanizmusát is a K1 toxin esetében tanulmányozták a legbehatóbban (MAGLIANI et al. 1997).



3.ábra. A K1 és K28 killer toxinok hatásmechanizmusa (SCHMITT&BREINIG 2002)

A szenzitív élesztősejt elpusztítását két lépéses folyamatként mutatja be. Először a toxin a sejt falon található R1 receptorhoz kötődik, majd az R2 receptorhoz a citoplazma membránon. A plazma membránnal való kölcsönhatás után a K1 toxin a sejten kívülről hat és megzavarja a citoplazma membrán működését. A K28 toxin endocitózissal jut be a sejtbe, hogy ott elérje célpontját, az élesztő sejtmagját. (Az R1 és R2 felszíni receptorok különbözőek mindkét toxin esetében.)

Több tanulmány arról számol be, hogy az érzékeny sejtekben a toxinkötő helyeknek két populációja található, amelyek nagyon különböző affinitással lépnek kölcsönhatásba a killer toxinnal. A kötődés első lépése erősen pH függő, optimuma 4,6. A killer toxin kis affinitással, nagy sebességgel adszorbeálódik a sejtfal receptorokhoz, amelyekből sejtenként átlagosan $1,1 \times 10^7$ molekula van jelen. A második lépés egy nagy affinitású, kis sebességű energia-függő kölcsönhatás a toxin és a lehetséges plazma membrán receptor között, ami a tényleges letális hatáshoz vezet. A sejtfal glükán frakciójának alkotóit, elsősorban a β -1,6-D-glükánt azonosították, mint elsődleges toxin receptort, és ezek összeállításához számos élesztő *KRE* (killer rezisztencia) génre van szükség. Az érett toxin mindkét alegysége szükséges a receptorhoz való kötődéshez. Elsősorban a hidrofil β alegység felelős a kötődésért, míg az α alegység multifunkcionális módon működik különböző, egymást részben takaró polipeptid régiókkal, amik szerepet játszanak a killer aktivitásban, immunitásban és a kötődésben is. Az élesztő sejtfalához való kötődést követően a K1 toxin a citoplazmatikus membránhoz szállítódik, ahol kölcsönhatásba kerül egy másodlagos toxin receptorral, ami a sejt felszínhez rögzített Kre1p fehérje. A toxin úgy fejt ki a hatását, hogy feszültségtől független kation csatornákat hoz létre a membránon, ami az ionok kiáramlását, a sejt összezsugorodását és azután halálát okozza (ALFENORE et al. 2003, BREINIG et al. 2006, MAGLIANI et al. 1997, MARTINAC et al. 1990).

A K2 toxin hatásmechanizmusát nem jellemezték még ennyire mélyrehatóan (NOVOTNÁ et al. 2004), de aktivitása tulajdonképpen megegyezik a K1 toxinéval, annak ellenére, hogy eltérő a szerkezete. A K1 és K2 killer törzsek képesek egymást elpusztítani, noha a saját toxinjukra immúnisak. A két killer fehérje termelődésének módja hasonló. A két toxin egyéb tulajdonságaiban is különbözik, például a molekulatömegben, az izoelektromos pontban és a pH optimumban.

A K28 toxin viszont úgy tűnik, más módon hat a sejtciklusra. A toxin elsősorban a sejtfal egyik 185 kDa nagyságú mannoпротеin-jének α -1,3 kötésű mannóz reziduumához kötődik (MAGLIANI et al. 1997). A toxin receptor közvetített endocitózissal kerül be az érzékeny sejtbe és miután a citoszolba szállítódik, blokkolja a DNS szintézist, majd a sejtciklus leállítását, és kaszpáz közvetített apoptózist eredményez (BREINIG et al. 2006). A leállítás a G2 fázisban következik be, ami ahhoz vezet, hogy az anya- és leánysejt nem tud elválni, és a sejtmag nukleusz az anyasejtben marad. Azt még nem sikerült tisztázni, hogy a toxin elsődleges vagy másodlagos hatása-e a korai, visszafordítható DNS szintézis gátlása.

2.2.1.5 Immunitás

A K1 és a K28 toxinoknak mind a szintézise, mind a hatása jól ismert. Mindezek ellenére, még mindig nem ismeretes az a mechanizmus, amivel a toxin termelő sejtek elkerülik a fehérjék halálos hatását. BREINIG és munkatársai (2006) a K28 toxint szintetizáló sejtek védekező mechanizmusát

vizsgálták. Kísérleteik igazolták, hogy a toxint a sejt felveszi – csakúgy, mint az érzékeny sejtek – és az a citoszolba szállítódik. A jelenlegi adatok azt is kimutatják, hogy mind a preprotoxin, mind az érett toxin jelen van a K28 termelő sejtek citoszoljában, és specifikus kölcsönhatás játszódik le közöttük. A kölcsönhatás eredményeként egy preprotoxin/K28 komplex jön létre, ami ubikináció (egy ubikinin hozzákötődik a komplexhez) majd az ezt követő lebontás célpontjává válik. Ez a hatékony és külső tényezőktől teljesen független mechanizmus lehetővé teszi, hogy a K28-at termelő sejtek inaktiválják a toxint, mielőtt a citotoxikus α toxin eléri a végső intracelluláris célját. Emellett pedig a mechanizmus nincs negatív hatással a toxin termelésre sem.

2.2.2 Killer rendszerek egyéb élesztő nemzetségekben

A *Saccharomyces cerevisiae* killer rendszerét tanulmányozták a legtöbbet, de számos más élesztő nemzetségnél is tapasztaltak hasonló jelenséget. YOUNG és YAGIU (1978) húsz – különböző nemzetségbe és fajba tartozó – killer élesztő közötti kölcsönhatásokat vizsgált, majd a killer tulajdonság és immunitás alapján tíz típusra osztotta őket K1-től K10-ig. Később még egy típust, a K11-t is leírták, de az utóbbi években felfedezett és vizsgált killer élesztőket még nem sorolták be ebbe a csoportosítási rendszerbe (IZGÜ&ALTINBAY 2004).

További nemzetségek, amelynek egyes fajai termelnek killer toxint: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, *Torulopsis*, *Ustilago*, *Williopsis*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* (BUZZINI et al. 2004, CHEN et al. 2000, IZGÜ&ALTINBAY 2004, IZGÜ et al. 2004, MAGLIANI et al. 1997, MARQUINA et al. 2001, MIDDELBEEK et al. 1980, SCHMITT&BREINIG 2002, TRÉTON et al. 1985). Megfigyelték, hogy a killer fenotípus kifejeződésének genetikai alapja meglehetősen változatos (2. táblázat).

2.táblázat A killer fenotípus kifejeződésének genetikai alapja élesztőkben (SCHMITT&BREINIG 2002)

ÉLESZTŐ	GENETIKAI ALAP	TOXIN GÉN
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dsRNS vírus	M1-, M2-, M28-dsRNS
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	dsRNS vírus	M-dsRNS
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	dsRNS vírus	M-dsRNS
<i>Ustilago maydis</i>	dsRNS vírus	M-dsRNS
<i>Kluyveromyces lactis</i>	lineáris dsDNS plazmid	pGK11
<i>Pichia acaciae</i>	lineáris dsDNS plazmid	pPac1
<i>Pichia inositovora</i>	lineáris dsDNS plazmid	pPin1
<i>Pichia kluyveri</i>	kromoszómális	nincs azonosítva
<i>Pichia farinosa</i>	kromoszómális	SMK1
<i>Pichia anomala</i>	kromoszómális	nincs azonosítva
<i>Williopsis mrakii</i>	kromoszómális	HMK

Ez a genetikai változatosság természetesen megjelenik az egyes toxinok hatásmechanizmusában is. Megbontják a citoplazmatikus membrán működését azáltal, hogy egy ioncsatornát hoznak létre, vagy beavatkoznak a sejtfal szintézisébe úgy, hogy gátolják a β -1,3-glükán szintézisét. Néhány esetben blokkolják mind a DNS szintézist, mind a sarjadzás menetét, vagy megállítják a sejtosztódását a G1 fázisban (IZGÜ&ALTINBAY 2004, TAKASUKA et al. 1995).

2.2.2.1 *Kluyveromyces lactis*

A véletlennek köszönhető, hogy GUNGE és munkatársai (1981) felfedezték a killer tulajdonságot a *Kluyveromyces lactis* élesztőben. Tizenhét élesztő nemzetség 70 törzsét vizsgálták DNS plazmidok után kutatva. Ekkor fedeztek fel két lineáris DNS plazmidot egy petite negatív *K. lactis* törzsben, amiket pGK1-nek és pGK2-nek neveztek el. Az előbbi plazmidot hordozó élesztő killer fenotípussal rendelkezett, elpusztítva a vizsgált *Saccharomyces cerevisiae* törzsek mindegyikét, illetve a vizsgált *Saccharomyces italicus* és *Kluyveromyces* faj egyes törzseit. A toxin három alegységből áll: az α egy oligoszachariddal glikozilált polipeptid, míg a β és a γ kisebbek és nem glikoziláltak. Az érett toxin véglegesen leállítja az érzékeny sejt sejtciklusát a G1 fázisban úgy, hogy az utána nem képes a mitotikus osztódásra. (MAGLIANI et al. 1997). Vizsgálatok azt is megmutatták, hogy a *K. lactis* által termelt toxin pH 5 és 7 között aktív, ami valószínűleg egyedül erre a toxinra jellemző, hiszen a legtöbb élesztő killer toxinnak pH 4,5-5 az optimális tartománya (GUNGE et al. 1981).

2.2.2.2 *Hanseniaspora uvarum* és *Zygosaccharomyces bailii*

A két élesztő killer fenotípusát lineáris dsRNS vírus okozza, melyek rendkívül hasonlítanak a *S. cerevisiae* ScV-L-A és ScV-M vírusaihoz. Mindkét élesztő hordoz L- és M-dsRNS-eket, valamint a *Z. bailii* egyes vad típusaiban egy Z-dsRNS is jelen van. Érdekessége és fontossága a két élesztő által termelt toxinnak, hogy azok széles spektrumú antimikotikus potenciállal bírnak. A toxin nem csak a fárohasztó basidiomycetes és fitopatogén gombák, hanem a humán patogén *Candida albicans* és *Sporothrix schenkii* ellen is halálos. A Zygocin (azaz a *Z. bailii* toxinja) pusztító képessége megközelíti bizonyos bakteriocinek és eukarióta defenzinek hatását (SCHMITT&NEUHAUSEN 1994, SCHMITT et al. 1997, SCHMITT&BREINIG 2002).

2.2.3 *Killer élesztők alkalmazása*

Az elmúlt években, évtizedekben mind a killer toxinokat, mind a toxinokat termelő élesztőket számos módon igyekeztek alkalmazni. Az élelmiszeriparban jelentős erőfeszítéseket tettek annak érdekében, hogy bevezessenek olyan új biotechnológiai folyamaton alapuló technológiákat (MAGLIANI et al. 1997).

Különös figyelmet kap azoknak a killer élesztőknek a használata, amelyeket fermentációs folyamatokhoz szelektáltak starter kultúrának. Néhány törzset már alkalmaznak a termelésben, míg mások még kísérleti szakaszban vannak.

2.2.3.1 Borászat

A killer élesztők előfordulása a spontán borerjesztésekben igen magas, azonban ez változik a fermentáció egyes szakaszaiban és az évjáratok során is, növekedő tendenciát mutatva az első évjáratától kezdve az azt követőekben, illetve az erjesztés megkezdésétől annak végéig (VAGNOLI et al. 1993). Az alkoholos erjesztés során a cukrok alkohollá és szén-dioxiddá alakulnak, a malolaktikus fermentáció pedig tejsav és szén-dioxid képződéséhez vezet. Ezek olyan folyamatok, amelyek a borok érzékszervi tulajdonságait befolyásoló vegyületeket eredményeznek, ezáltal meghatározzák a minőségüket is. Ebből következik, hogy a biotranszformációért felelős mikroorganizmusokat – baktériumokat és élesztőket – behatóan tanulmányozzák azzal a céllal, hogy optimalizálják a mikrobiális anyagcseréjüket az ipari alkalmazásnak megfelelő irányba.

A bor spontán erjesztésének kezdeti szakaszában *Kloeckera*, *Metschnikowia* és *Hanseniaspora* élesztők is részt vesznek. Ezek természetesen fordulnak elő a szőlőn és a mustban. Hogy elhárítsák a nem standardizált körülmények okozta problémákat, borászatilag szelektált tiszta kultúrákból származó fajokat használnak.

Az élesztők genetikai manipulálása új transzformált törzseket eredményez, amelyek a borkészítés szempontjából olyan lényeges tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a gyors erjesztés, az alkoholdermélés, a SO₂ rezisztencia, a β -1,4-endoglükánáz szintézis, a flokkuláció és a kedvező aromatermelés, és emellett killer fenotípusúak, ami kedvez az endemikus mikrobióta elleni antagonizmusnak. Korlátozott értéket képvisel, ha olyan *S. cerevisiae* killer izolátumot használnak, aminek toxikus hatása csak az azonos faj törzseire korlátozódik. A nemzetségek és fajok közötti ismert „killer-érzékeny” kölcsönhatások alapján tanulmányokat végeztek, hogy létrehozzanak egy olyan superkiller élesztőt, ami többszörös killer faktorral rendelkezik és képes megelőzni a fertőzést a taxonómiaiilag nem rokon élesztőkkel szemben. Az ideális starter kultúra „jelöltet” a következőképpen képzelik el: az élesztő ellenáll a mikrobiális toxinoknak és olyan toxint termel, ami elpusztítja az endemikus élesztőket, penészeket és baktériumokat. Létrehozására különböző genetikai módszereket próbáltak ki.

2.2.3.2 Sütőipar

IZGÜ és munkatársai (2004) egy olyan *Saccharomyces cerevisiae* élesztőbe transzferáltak K3 killer tulajdonságot protoplaszt fúzióval, amely széles körben alkalmazott Törökországban a sütőiparban. Erre azért volt szükség, mert azonosítottak egy K3 és K8 típusú toxint termelő *Candida tropicalis* killer törzset, ami súlyos problémákat okozott a sütőélesztő szaporítása során. A művelettel a

S. cerevisiae törzs rezisztenssé vált a fertőző élesztő toxinjával szemben. Hasonló sikeres munkáról számoltak be BORTOL és munkatársai (1986), akik olyan killer sütőélesztőt hoztak létre, amelyek az ipar szempontjából fontos tulajdonságai (felhajtó erő, különböző szénhidrátok fermentációja és asszimilációja) a szülői törzssel megegyezők voltak.

2.2.3.3 Élelmiszeripari vonatkozású ozmofil és halofil killer élesztők

Szintén ipari érdeklődésre tarthat számot az ozmofil killer élesztők felfedezése, amelyek a killer aktivitást csak nagy koncentrációjú sók, pl. NaCl vagy KCl jelenlétében fejtik ki. *Kluyveromyces* törzsek killer aktivitását vizsgálták *Zygosaccharomyces rouxii* ellen sók jelenlétében, és találtak olyan izolátumokat, amelyek hasznosak lehetnek egy olyan természetes tartósítószer kifejlesztésében, ami megelőzi a sózott fermentált élelmiszerek újra-fermentációját (MAGLIANI et al. 1997).

Mivel a halotoleráns és halofil élesztők fontos szerepet játszanak a szójaszós és egyes sózott zöldségek érzékszervi tulajdonságainak kialakításában, elképzelhető lenne a nemkívánatos fertőző mikrobák gátlása killer élesztők alkalmazásával. Például az olívabogyó pácléből izolált *Candida boidinii* IGC3430 érzékenynek bizonyult, amely lipolitikus aktivitásával és a tejsav asszimilációjával káros hatást fejt ki.

2.2.4 Killer élesztők létrehozása

A sörélesztő genetikai módosítása – akárcsak az ilyen módon megváltoztatott tulajdonságokkal rendelkező egyéb alapanyagok használata – a mai napig igen kényes kérdésnek számít a sörgyártók körében. Ezzel párhuzamosan és ennek ellenére azonban, a söripari kutatások egy része már évtizedek óta ezzel a témával foglalkozik.

Az élesztő genetikai módosítására két alapvetően különböző megközelítés létezik (ISERENTANT 1989). Az egyik megközelítésben egy már létező törzset csak csekély mértékben változtatnak meg – új tulajdonságot adva neki – anélkül, hogy a törzs többi jellegzetességét ez érintené. Az ilyen változtatást mutagenézissel, klónozással és transzformációs technikákkal lehet elérni. A másik megközelítésben viszont egy teljesen új törzset hoznak létre úgy, hogy létező törzsekből származó „építőköveket” raknak össze. Az így létrejövő kombinációnak hordoznia kellene minden pozitív tulajdonságot az egyes építőkövekből. Erre alkalmas módszerek a spóráképzés és hibridizálás, valamint a *protoplaszt fúzió* és a *rare-mating* (ritka párosodás). A killer sörélesztők létrehozása ez utóbbi kategóriába sorolható.

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőt már évezredek óta tenyésztik és használják sör-, bor-, illetve kenyérgyártáshoz. Egészen új szerepet kapott, mikor a genetikai vizsgálatok egyik kedvenc alanya lett. Azonban figyelembe kell venni, hogy az a haploid törzs, amit a molekuláris biológusok választottak laboratóriumi munkájukhoz, teljesen alkalmatlan ipari használatra. A sörélesztő

pontosan úgy szelektálódott az idők folyamán, hogy azokkal a tulajdonságokkal rendelkezzen, ami ellenállóvá teszi a laboratóriumi genetikai manipulálással szemben. Általában poliploidok vagy aneuploidok, nem rendelkeznek mating típussal, gyenge spóráképzők vagy egyáltalán nem spóráznak. Ha létrejönnek spórák, akkor azok nem négyesével fordulnak elő, gyenge a viabilitásuk, ami megnehezíti a tetrád analízist (RUSSEL&STEWART 1985).

Természetesen ennek ellenére végeznek genetikai kísérleteket sörélesztőkkel is. A kísérletek egyik köre killer tulajdonsággal rendelkező sörélesztők létrehozására törekszik. Ugyan volt már arra precedens, hogy sörgyárban izoláltak ilyen élesztőt, azonban a killer jelenség sokkal ritkább a sörélesztők, mint például a borélesztők között (YOUNG 1981). A fent említett módszerek közül a protoplaszt fúziót és a rare-matinget alkalmazták erre (MARÁZ et al. 1994, YOUNG 1981, HAMMOND&ECKERSLEY 1984, ISERENTANT&VAN DE SPIEGLE 1988, SASAKI et al. 1984).

2.2.4.1 Killer sörélesztők létrehozása rare-mating módszerrel

A rare-mating vagy ritka párosodás módszere azon alapszik, hogy ha nagy tömegben kevernek össze amúgy párosodásra képtelen haploid sejteket, akkor ritkán mégis előfordulhat egyesülés, amit erős szelekciós hatással ki lehet mutatni (DEÁK 1998).

YOUNG 1981-ben, majd HAMMOND és ECKERSLEY három évvel később 1984-ben közölt publikációt arról, hogyan alkalmazták a rare-mating módszert killer sörélesztő létrehozására.

YOUNG (1981) nem csupán ezt az egy módszert használta, hanem kísérletében két genetikai manipulációs technikát kombinált. Egyfelől a SPENCER és SPENCER (1977) által leírt rare-matinget, amelyben egy légzés-deficiens (*petite*) sörélesztőt és egy auxotróf „laboratóriumi” törzset kevert. A hibrideket olyan táptalajon szelektálta, hogy csak a prototróf és nem légzés-deficiens sejtek legyenek képesek kinőni. A módszer hátrányának tekinthető, hogy így valódi hibridek jönnek létre, ami azt jelenti, hogy mindkét szülőnek mind a sejtmagban, mind a citoplazmában hordozott génjeit tartalmazza. Emiatt nem valószínű, hogy a sörélesztő törzsnek csak az előnyös tulajdonságait fogja hordozni a hibrid. Young módszeréhez másfelől felhasználta CONDE és FINK (1976) munkájának eredményét is, akik leírták az *S. cerevisiae* egy olyan mutációját (*rövidítése kar*), amely megakadályozza a sejtmagok fúzióját (a kariogámiát) laboratóriumi haploid élesztők hibridizációját követően. Az így kapott heterokarionok nem stabilak; két olyan sejt jön létre (heteroplazmon), amelyek az egyik, illetve másik szülő sejtmagját hordozzák, de mindkét szülő citoplazmájának tartalmát. Tehát Young által a killer sörélesztő létrehozásához felhasznált egyik szülői törzs haploid killer volt, auxotróf, nem légzés-deficiens és *kar* mutáns, míg a másik egy nem killer sörélesztő, poliploid és légzés-deficiens (*petite*). A rare-mating során így létrejött (1) killer, nem légzés-deficiens, auxotróf heteroplazmon, ami a haploid szülő sejtmagját hordozta; (2) killer,

nem légzés-deficiens heteroplazmon, ami a sörélesztő sejtmagját hordozta; (3) killer, légzés-deficiens, heteroploid valódi hibrid. Megfelelő szelektív táptalajok és módszerek segítségével ezek elválaszthatók. A módszer előnye a hagyományos rare-matinggel szemben, hogy itt létrejönnek nem valódi hibridek is (heteroplazmonok), amelyek csak a kutató által kívánatosnak ítélt tulajdonságot – ebben az esetben a sörélesztő és killer voltát – hordozzák.

HAMMOND és ECKERSLEY 1984-es munkája az előbbi módszer kismértékben módosított változata, melyben tulajdonképpen két lehetőséget is leírnak a killer sörélesztő létrehozására – egy lépésben, illetve két lépésben. Az egy lépéses esetben a sörélesztőből létrehozott petite mutáns volt az egyik szülő és egy killer, auxotróf haploid laboratóriumi élesztőtörzs a másik. Az így kapott killer sörélesztő sejtek egyik negatívuma, hogy az általuk hordozott mitokondriumok a killer haploid sejtől származtak. A két lépéses módszer ezt a hiányosságot is kiküszöböli. Az első fázisban egy sörélesztő törzs és egy petite mutáns, auxotróf, killer élesztő törzs voltak a szülők, amelyek rare-matingje után az auxotróf, nem légzés-deficiens sejteket szelektálták, amik viszont a sörélesztők mitokondriumával rendelkeztek. Ezeket a sejteket újabb rare-matingnek vetették alá, ahol a másik szülő egy sörélesztő törzs petite mutánsa volt. A művelet után olyan sörélesztő sejteket tudtak szelektálni, amelyek killer tulajdonsággal és sörélesztő mitokondriummal rendelkeztek.

2.2.4.2 Killer sörélesztők létrehozása protoplaszt fúzióval

A protoplaszt fúzió módszerét először növényi sejteken alkalmazták. A mikroorganizmusok közül a gombák és baktériumok protoplaszt fúziójáról 1976-ban jelentek meg tanulmányok. Egy évre rá 1977-ben két egymástól független kutatócsoport ismertette a módszer alkalmazását élesztőkre (FERENCZY&MARÁZ 1977, VAN SOLINGEN&VAN DER PLAAT 1977).

A módszer első lépése, hogy a sejtfalet litikáz enzimmel lebontják, így képzik a csak membránnal körülvett sejtet, amit protoplasztnak vagy szferoplasztnak neveznek. A protoplasztokat a továbbiakban ozmotikusan stabilizált környezetben kell tartani, így akár 24 órán át megtartják mind fúziós, mind regenerációs képességüket. Következő lépésben a különböző élesztőtörzsekből készített protoplasztokat összekeverik és fúziójukat indukálják – legtöbbször kémiaiilag, polietilén glikollal (PEG) kalcium jelenlétében, vagy nagy erősségű elektromos térrel. A PEG alkalmazása –, amit KAO és MICHAYLUK (1974) javasolt először – egyfajta áttörésnek tekinthető, mert lényegesen megnövelte a fúziók gyakoriságát. Harmadik lépés a regenerálás, amikor a sejtfalet újraképződik. A fúziós termékek szelektálása a szülői törzsek által hordozott szelekciós tényezők segítségével történik, ami lehet auxotrófia, mutáció (pl. légzés-deficiens mutáns) vagy rezisztencia. (DEÁK 1998, VAN SOLINGEN&VAN DER PLAAT 1977).

A protoplaszt fúzió az ipari élesztőtörzsek genetikai manipulációjának nagyon fontos eszköze. Számos sikeres kísérletet írtak le sör-, bor- és sütőélesztőkkel (BARNEY et al. 1980,

DE FIGUEROA et al. 1984, ISERENTANT&VAN DE SPIEGLE 1988, SKATRUD et al. 1980). A módszer nem függ sem a ploiditástól, sem a mating típustól, így különösen jól alkalmazható a poliploid természetű és mating típust nélkülöző sörélesztők esetében (RUSSEL&STEWART 1985).

A jó sör előállítása nagyban függ az erjesztés minőségétől. Maga a folyamat a fermentációs körülmények és az alkalmazott sörélesztő törzs tökéletes kombinációja kell, hogy legyen. Akár a körülményekben, akár az élesztőben bekövetkező legkisebb változás is élvezhetetlen terméket eredményezhet. Emiatt a sörfőzők igen vonakodva fogadják, ha bármilyen módon manipulálják az élesztő törzset, még ha az csak egy apró mutáció is.

Protoplaszt fúzióval a killer toxin termelő képesség is bevihető a sörélesztő sejtjeibe. Az ezzel a témával foglalkozó kutatók cikkeikben, szinte kivétel nélkül, két szempontot emelnek ki: a sörélesztő így rendelkezne rezisztenciával a killer élesztőkkel szemben, illetve a saját maguk által termelt toxinnal el tudnák pusztítani a behatól érzékeny élesztőket (MARÁZ et al. 1994, YOUNG 1983). SASAKI és munkatársai (1984) olyan killer sörélesztőt hoztak létre ezzel a módszerrel, ami antibakteriális tulajdonsággal is rendelkezik.

SASAKI és munkatársai (1984) két lépésben oldották meg azt, hogy a létrehozandó sörélesztő ne csak killer legyen, hanem antibakteriális tulajdonsággal is rendelkezzen. Az első lépésben a légzés-deficiens mutáns antibakteriális élesztőt és a killer élesztőt hibridizáltak, amelyek ellentétes mating típussal rendelkeztek. Glicerines minimum táptalajon prototróf légzés-deficiens hibrideket szelektáltak a protoplaszt fúzióhoz. A szelektált hibridek spóráztatása után olyan haploid klónokat kerestek, amelyek a killer és antibakteriális tulajdonság mellett auxotrófok is voltak, mert a későbbi protoplaszt fúzióhoz ez szükséges. A második lépés már maga a fúzió volt, amihez a sörélesztőből is petite mutánsokat hoztak létre. A killer-antibakteriális és a petite sörélesztő sejtekből létrehozott protoplasztokat a szokásos módon fuzionáltatták PEG jelenlétében, majd a kívánt tulajdonságokkal rendelkező sejteket szelektálták több lépésben.

A MARÁZ és munkatársai (1994) által kidolgozott módszer esetében nincs szükség a sörélesztő mutagén kezelésére vagy bármilyen genetikai módosításra a fúzió előtt. A fúziós termékeket az általuk termelt killer toxin alapján szelektálták. A toxin elpusztította a szülői sörélesztő sejteket, és csak a killer fúziós termékek tudtak regenerálódni és növekedni.

2.2.5 Killer sörélesztők erjesztő képességének vizsgálata

A fentiekben részletezett két genetikai manipulációs módszert a kutatók természetesen nem csupán a módszerek kipróbálása végett végezték el, hanem, hogy új tulajdonsággal rendelkező *sörélesztőt* hozzanak létre. Ezért a sikert nem csak azon lehet – illetve kell – lemérni, hogy elpusztítja-e az élesztő az érzékeny sejteket, hanem azon is, hogy milyen erjesztési képességgel bír.

Ezzel a vizsgálattal a kutatók eltérő mélységgel foglalkoztak. SASAKI és munkatársai (1984) több fúziós terméket is „elővizsgálatnak” vetettek alá 20°C-n való erjesztéssel, majd a legígéretesebbel egy részletesebb vizsgálatot végeztek el, 20 liter sörlé erjesztésével. Ebben 8 napig tartott a főerjesztés 10°C-n, majd 32 napig az ászokolás 0°C-n. Az extrakttartalom csökkenését nyomon követték, és alakulását összehasonlították a szülői sörélesztő teljesítményével. A killer sörélesztő kezdetben kissé lassabban fermentált, de a 14. napra szinte egyforma mértékben használták fel a sörlé szénhidrátjait. Az érzékszervi panel szerint a killer sörélesztővel erjesztett sör íze és habja elfogadható volt. A fermentáció során vizsgálták a killer toxin és antibakteriális aktivitás alakulását is. Az előbbi a 3. naptól az 5. napig volt a legnagyobb, majd fokozatosan csökkent. Az utóbbi aktivitása a főerjesztés végén (8. nap) volt a legnagyobb, és az ászokolás során végig viszonylag nagy maradt. Ugyan a killer sörélesztő által termelt killer faktort instabillnak minősítették, ennek ellenére úgy gondolják, hogy alkalmas lehet a vadélesztők elleni védekezésben. Az antibakteriális aktivitást viszont gyengébbnek minősítették normál erjesztési körülmények között, mint a 20°C-n és kisebb mennyiségű sörlével végzett laboratóriumi kísérletekben. Az erjesztés során mért legnagyobb aktivitás sem volt elegendő arra, hogy a 11 tesztelt sörkárosító baktériumból 3-at elpusztítson (a baktériumok kezdő koncentrációja 2×10^5 sejt/ml volt és 25°C-n 10 napig tartott az inkubáció).

A killer és nem killer sörélesztők erjesztését összehasonlítva MARÁZ és munkatársai (1994) sem tapasztaltak jelentős különbségeket. A sör valódi és látszólagos extrakttartalmát és erjedésfokát, valamint a képződött alkohol és diacetil mennyiségét mérték. A fent említett kísérletekkel ellentétben, mind az érzékszervi panel minősítése, mind a mért értékek jobbnak bizonyultak a killer sörélesztő esetében. A killer toxin jelenlétét nem vizsgálták.

YOUNG 1981-ben nem protoplaszt fúzióval, hanem – ahogy a 2.1.5.1 fejezetben bemutattam – rare-mating technikával hozott létre killer sörélesztőt. Egy két évvel későbbi kísérletben (YOUNG 1983) vizsgálta ennek erjesztési tulajdonságait, kontroll sörélesztő tulajdonságaival összevetve. Mivel olyan genetikai manipulációs technikát alkalmazott, amely során a sörélesztő nukleáris genomja nem változott, joggal várta, hogy fermentációs képessége is a szülői törzshöz hasonlatos legyen. Félüzemi kísérletben 5-7 napig tartott az (fő)erjesztés 17°C-n – a szülő felsőerjesztésű sörélesztő lévén –, majd az élesztő elvétele után két hétig 4-5°C-n érlelték a terméket. A sör extrakttartalmát, színét, pH-ját, habtartósságát és összes nitrogén tartalmát mérték, valamint gázkromatográffal meghatározták két észter (etil-acetát és izo-amilacetát), négy kozmaolaj (propanol, 2-metil-propanol, 2-metil-butanol és 3-metil-butanol) és a diacetil koncentrációját. Megállapította, hogy a két vizsgált killer sörélesztővel erjesztés szinte minden tulajdonságában ugyanolyan sört eredményezett, mint a kontroll sörélesztő. Lényeges különbséget mindkét törzsnél a 2-metil-propanol tartalomban, illetve az egyik törzsnél még a 3-metil-butanol mennyiségében

tapasztalt. Ezt az eltérést azzal magyarázta, hogy a mitokondrium származhat a killer szülőből is, aminek befolyása lehet a kozmaolaj termelésre. Az analitikai vizsgálatokon túl a 31 tagú érzékszervi panel sem mutatott ki különbséget a killer és nem killer sörélesztővel előállított sörök között.

HAMMOND és ECKERSLEY (1984) szintén rare-mating módszerrel hoztak létre killer sörélesztőket, amihez szülői törzsként mind felsőerjesztésű (ale), mind alsóerjesztésű (lager) sörélesztőket felhasználtak. Ezzel a módszerrel valódi hibridek és heteroplazmonok is keletkeztek, és mindkét esetben voltak sejtek, amelyek a sörélesztő és olyanok is, amelyek a killer élesztő mitokondriumot hordozták. Igen alapos és széleskörű vizsgálataik során laboratóriumi és félüzemi méretben is végeztek erjesztéseket. A *laboratóriumi fermentációk* során azt tapasztalták, hogy a heteroplazmonok és hibridek erjesztési sebessége – néhány kivételtől eltekintve – nem érte el a kontroll sörélesztőét. Az is általános jelenség volt, hogy ezeknek a söröknek a pH-ja magasabb volt, mint a kontroll söröké. A kész sörök vizsgálata során a heteroplazmon sejtek alkalmazásával készült végtermékek érzékszervileg szinte megegyeztek a kontroll sörökkel. A *félüzemi kísérletekben* már csak a legjobban szereplő törzseket alkalmazták: két ale sörélesztő és a belőlük származtatott killer élesztők (mindkettő heteroplazmon, sörélesztő mitokondriummal), illetve egy lager sörélesztő és a belőle származtatott killer élesztő (szintén heteroplazmon, killer mitokondriummal). Az eredmények hasonlóak voltak a kisebb volumenben végzett erjesztéshez: a killer sörélesztők általában lassabban erjesztettek (az egyik ale törzs esetében jelentősen lassabban), magasabb pH-jú volt a sör, de a kész sörök elfogadhatóak voltak. A lager killer sörélesztő termékét tartották a a kontroll sörtől leginkább eltérőnek. A termék kevesebb illékony aromát hordozott és kissé savanyú és kénes volt, bár mindezek ellenére elfogadhatónak minősítették. A különbséget azzal magyarázták a szerzők, hogy ez a killer sörélesztő nem a sörélesztő szülőből, hanem a killer szülőből származó mitokondriumot hordozta. Természetesen nem a mitokondriumok különbözősége az egyedüli ok, ami különbséget okozhatott; más extra-mitokondriális elemek is szerepet játszanak, mivel az azonos mitokondriumot hordozó heteroplazmonok erjesztési képességei között is jelentős eltéréseket tapasztaltak.

2.3 KÖLCSÖNHATÁSOK A MIKROORGANIZMUSOK KÖZÖTT

A nem steril körülmények közt zajló biofolyamatokban számos mikroba faj él együtt. Ebben az esetben az alapanyag biotranszformációját nem csak az egyes mikroorganizmusok viselkedése befolyásolja, hanem a mikroorganizmusok közötti kölcsönhatás is. Ha szabályozni akarnak egy kevert kultúrát, akkor modellezni kell ezeket a kölcsönhatásokat. Az a cél, hogy előre jelezzék a populációk koncentrációjának újbóli megoszlását a mikroba rendszerben és ennek kihatását a végtermék minőségére: az érzékszervi és fizikai-kémiai tulajdonságaira és a fertőzöttségére (POMMIER et al. 2005).

Georgij Frantsevics *Gause* orosz biológus (1910-1986) tekinthető a kevert mikrobakultúrákkal foglalkozó kutatások, illetve a mikrobiális ökológia atyjának. Ő volt az első, aki a „létért folyó küzdelem (azaz az ökoszisztéma dinamikája) elemi folyamatait (azaz a populációk kölcsönhatása)” próbálta elkülöníteni. Már az 1930-as évek elején publikált cikkeket (GAUSE 1932) ebben a témában, 1934-ben pedig „A létért folytatott küzdelem” címen jelent meg könyve.

Dolgozatomban csak érintőlegesen kívánok foglalkozni a mikrobiális ökológia témájával. Olyan mélységben, ami a kevert mikroba – elsősorban élesztő – kultúrákban előforduló kölcsönhatásokat segít megérteni.

2.3.1 *Kölcsönhatások osztályozása*

FREDRICKSON (1977) összefoglaló jellegű cikkében korábbi közleményekre utalva írja, hogy – legtöbbször csak a populációra gyakorolt hatásán alapulva – a kölcsönhatásokat „jótékony” és „ártalmas” csoportba sorolták. A jótékony általában azt jelenti, hogy serkenti a növekedést, míg az ártalmas azt, hogy gátolja a növekedést, vagy serkenti a pusztulást, a sejt bomlást. Ennek az osztályozásnak az a hátránya, hogy két meglehetősen különböző viselkedés ugyanazon a helyen található az osztályozástani rendszerben.

A FREDRICKSON (1977) által ajánlott új rendszer megtartotta a régi jól megalapozott, logikus felépítését, mindössze egy magasabb osztályozási szintet adott hozzá. Nevezetesen, **direktnek** nevezhető egy kölcsönhatás, ha a két populáció egyedei között szükségszerűen fizikai kapcsolat jön létre. Ha pedig a kölcsönhatás nem feltétlenül jár fizikai érintkezéssel, illetve ha az élettelen környezet szükséges közvetítő a két populáció között, akkor **indirektnek** hívják. Általában az indirekt kölcsönhatásoknak nincs olyan fokú sajátlagossága, ami a direkt interakciókat gyakran jellemzi. Lehetséges, hogy emiatt a biológusok némileg elhanyagolták azokat, mivel számukra egy kölcsönhatásnak éppen a sajátlagossága a legérdekesebb aspektusa.

VERACHTERT és DAWOUD 1990-ben közölt összefoglaló jellegű cikkében az élesztők szerepét elemzi különböző kevertkultúrákban. A cikk túlnyomó része a téma élelmiszeripari vonatkozásaival foglalkozik, de az elején rövid áttekintést ad a kevertkultúrák típusairól. A szerzők egy újfajta osztályozást javasolnak: a mikroba közösségeket különböző struktúrákba, szervezetekbe sorolják az alapján, hogy milyen okból alakul ki közöttük a kölcsönhatás (3. táblázat).

3.táblázat Mikrobiális közösségi struktúrák (VERACHTERT&DAWOUD 1990)

1. STRUKTÚRA	Meghatározott tápanyagok biztosítása különböző tagok között (+ +, + 0 vagy 0 + típus)
2. STRUKTÚRA	„B” mikroorganizmus eltávolít egy „A” mikroorganizmus által termelt vegyületet, ami gátló hatású „A” számára
3. STRUKTÚRA	„A” mikroorganizmus modifikálja „B” szaporodási feltételeit (+ + vagy + 0, - 0 típus)
4. STRUKTÚRA	Kombinált anyagcsere tevékenységek (+ + típus)
5. STRUKTÚRA	Közös metabolizmus (+ 0 típus)
6. STRUKTÚRA	Fajok közötti hidrogén transzfer (+ + típus)
7. STRUKTÚRA	Több, mint egy elsődleges szubsztrátum felhasználó jelenléte

Az 4. táblázat bemutatja, hogy milyen lehetséges kölcsönhatások alakulhatnak ki „A” és „B” mikroorganizmusok populációi között.

4.táblázat „A” és „B” mikroorganizmusok között lehetséges kölcsönhatások (VERACHTERT&DAWOUD 1990)

„B” POPULÁCIÓ HATÁSA „A” POPULÁCIÓRA	„A” POPULÁCIÓ HATÁSA „B” POPULÁCIÓRA		
	+	-	0
+	++	+ -	+ 0
-	- +	- -	0 -
0	0 +	0 -	0 0

++: a két mikroba pozitív hatással van egymásra

--: a két mikroba negatív hatással van egymásra

00: a két mikroba nincs hatással egymásra

+/-+: az egyik mikroba pozitívan, a másik negatívan hat

+0/0+: az egyik mikroba pozitívan hat a másikra; a másiknak nincs hatása

-0/0-: az egyik mikroba negatívan hat a másikra; a másiknak nincs hatása

2.3.1.1 Főbb kölcsönhatások

A kevert kultúra tenyészetek főbb kölcsönhatásait mind FREDRICKSON (1977), mind VERACHTERT és DAWOUD (1990) közleményei alapján foglalom össze.

Versengés (- - típus, indirekt kölcsönhatás)

Erőforrás típusú versengés (vagy egyszerűen *versengés*): mindkét populációra negatív hatással van a kölcsönhatás, melynek során mindegyik populáció olyan vegyületet távolít el a közös környezetből, ami a másik növekedéséhez szükséges. *Beavatkozó típusú versengés*: szintén negatív mindkét populációra, de azáltal, hogy azok olyan vegyületet termelnek, ami a másik populáció növekedését gátolja vagy mérgező a számára. Két mikroorganizmus populáció, amelynek hasonló a tápanyagigénye, számos közös és szükséges tápanyagért fog versengeni, ha együtt szaporodnak.

Más antagonisztikus indirekt kölcsönhatások (indirekt kölcsönhatások)

Ezeket a kölcsönhatásokat az jellemzi, hogy legalább az egyik populáció olyan anyagokat bocsát a tápközegbe, aminek negatív hatása lesz a másikra.

Amenzalizmus (- 0 vagy 0 -): ebben az esetben a negatív hatás csupán a növekedés gátlása. Ez az eset áll fenn, ha az egyik populáció antibiotikumot, enzimet vagy például killer toxint termel.

Indirekt parazitizmus: a negatív hatás mindenképpen a sejt líziséhez vezet.

Kommenzalizmus (0 + vagy + 0 típus, indirekt kölcsönhatás)

VERACHTERT és DAWOUD (1990) az 1. és a 5. struktúrába sorolja az ide tartozó interakciókat (3. táblázat). Különböző mechanizmusok eredményezhetnek kommenzalista kölcsönhatást. A két leggyakrabban említett eset az amikor (1) az egyik populáció olyan anyagokat termel a másik számára, ami annak növekedéséhez létfontosságú; illetve amikor (2) az egyik populáció eltávolít egy olyan anyagot, ami a másik növekedését gátolná.

Mutualizmus és protokooperáció (+ + típus, indirekt kölcsönhatások)

Ezt a két kifejezést olyan esetben használják, amikor mindkét populációra pozitív hatással van a kölcsönhatás.

Mutualizmus: az egyik populáció olyan vegyületet (vagy vegyület csoportot) termel és választ ki a tápközegbe, amit a másik saját maga nem képes előállítani. VERACHTERT és DAWOUD (1990) saját osztályozásuk alapján a mutualizmus különböző eseteit az 1., a 2., a 3. és a 4. struktúrába sorolják (3. táblázat).

Protokooperáció: míg az előző esetben a kölcsönhatás obligát mindkét populáció túléléséhez, addig a protokooperáció esetén ez nem igaz. FREDRICKSON (1977) ennek a kifejezésnek a használatát igazából csak arra a szituációra ajánlja, amikor a kölcsönhatás egyik populáció túléléséhez sem szükséges. VERACHTERT és DAWOUD (1990) saját osztályozási rendszerükben a protokooperációt a 6. struktúrába sorolják (3. táblázat).

Szimbiózis (+ + típus, direkt kölcsönhatás)

A Biológia Értelmező Szótár (HALE et al. 1997) definíciója szerint a szimbiózis (együttélés) olyan kapcsolat két különböző fajú populáció tagjai között, amely mindkét fél számára előnyös. FREDRICKSON (1977) szerint a szimbiózis egy nagyon specifikus, direkt kölcsönhatás és nem alkalmazható a mutualizmus vagy a protokooperáció helyett.

Predáció és parazitizmus (+ - vagy - + típus, direkt kölcsönhatások)

Predáció: VERACHTERT és DAWOUD (1990) szerint ezt az interakció típust legjobban a baktérium-protozoa közösségek reprezentálják, amelyek szennyvíz kezelőkben találhatók meg.

Parazitizmus: legtöbb információ a vírusok és a *Bdellovibrio* parazitizmusáról baktériumokon (FREDRICKSON 1977).

2.4 KEVERT MIKROBA KULTÚRÁK AZ ÉLELMISZEREKBE

Kevert mikroba kultúrák számos helyen találhatók a természetben. További jellemző előfordulási helyeik a szennyvízkezelő berendezések (TANO-DEBRAH et al. 1999), az állatok emésztő rendszere és a fermentált élelmiszerek (VERACHTERT&DAWOUD 1990). Dolgozatomban csak ez utóbbiakról kívánok foglalkozni.

VERACHTERT és DAWOUD 1990-ben írott cikkében kimerítő listát állított össze azokról az élelmiszerekről – a világ minden tájáról – amelyben kevert mikroba kultúrák találhatók, illetve azt használnak fel készítésükhöz. Közöttük megtalálhatóak levesek, fűszerek, ízesítők, italok, borok és sörök is.

2.4.1 *A bor*

Hagyományosan a szőlőmust erjesztésében számos, a természetben előforduló élesztő vehet részt, amelyek természetesen fordulnak elő benne. Napjainkban a nagyüzemi borászatok azonban starterkultúrát alkalmaznak, amelyek olyan élesztőt tartalmaznak, amit az adott borvidék élesztőflórájából izoláltak vagy amit erre szakosodott cégek tartósított (pl. szárított) állapotban forgalmaznak (PRETORIUS 2000). Természetesen a hagyományosnak tekinthető borerjesztés is igen széles körben elterjedt, hiszen a termék minőségét gazdagítja, ha nem csak egyféle élesztő végzi a fermentációt. Ezt hangsúlyozzák ROMANO és munkatársai is (2003), akik *Saccharomyces* és nem-*Saccharomyces* élesztőket egyaránt tartalmazó starterkultúra használatát ajánlják.

A spontán borerjesztést egymást követő különböző élesztő populációk végzik. A korai fázist bizonyos nem-*Saccharomyces* élesztők (a *Candida*, *Kloeckera* és *Hanseniaspora* nemzetségekhez tartozók) növekedése jellemzi, majd a késői fázisban mindig az alkoholtűrő *S. cerevisiae* törzsek vannak túlsúlyban (PRETORIUS 2000). Több nem-*Saccharomyces* törzsre napjainkban már úgy tekintenek, hogy tevékenységük kedvező a bor ízének kialakításában, mert a *S. cerevisiae* törzseknél nagyobb mennyiségben termelnek bizonyos anyagcsere-termékeket, pl. glicerint, észtereket és magasabb rendű alkoholokat. Ugyanakkor ezeknek a törzseknek a növekedése általában az erjedés első 2-3 napjára korlátozódik, pusztulásuk után utat adva a *Saccharomyces cerevisiae* törzseknek. Több okkal magyarázzák a jelenséget. Általános vélekedés szerint a *Saccharomyces* törzsek jobban ellenállnak a növekvő alkohol és szerves sav koncentrációnak, a csökkenő pH-nak és a tápanyagok kimerülésének. Továbbá a kezdeti mikroflóra és a must kémiai összetétele, valamint olyan külső tényezők, mint a kén-dioxid adagolás, az erjesztési hőmérséklet és a starterkultúrák használata, erős szelekciós hatást gyakorol az élesztő fajokra a borerjesztés folyamata során (CONSTANTÍ et al 1998). Ezeknek a klasszikus szelekciós tényezőknek uralkodó/túlsúlyban lévő szerepét mostanában megkérdőjelezzik és más, eddig nem meghatározott,

mikroba-mikroba kölcsönhatások kerülnek előtérbe mint lehetséges tényezők, melyek befolyásolják az élesztők sorrendjét (CIANI&PEPE 2002, FLEET 2003, NISSEN&ARNEBORG 2003).

Több olyan vegyületet is termelhetnek az élesztők az alkoholos fermentáció során, ami gátolhat más élesztő fajoknak vagy törzseknek. Az etanolon kívül bizonyos anyagcsere-termékek, mint például a rövid- és közepes-láncú zsírsavak (pl. ecetsav, kapronsav, kaprilsav, kaprinsav) elérhetnek olyan koncentrációt, ami egyes élesztő fajoknál – köztük néhány *S. cerevisiae* törzsnél – sejthalálhoz vezetnek (LUDOVICO et al. 2001, FLEET 2003). Az élesztők killer tevékenysége is egyfajta gátló mechanizmus az erjedés során.

Az előzőekben említett beszámolók ellenére a nem-*Saccharomyces* élesztők korai pusztulása a *S. cerevisiae*-t is tartalmazó kevert kultúrák erjesztése során, alig kerül említésre a szakirodalomban. Első gondolatként a nem-*Saccharomyces* élesztők – *S. cerevisiae*-hez hasonlítva – alacsonyabb etanol toleranciájának tulajdonítják a pusztulást. Valójában csak néhány alapos tanulmány készült azzal a céllal, hogy tisztázza az okokat és a jelenség alapjául szolgáló mechanizmusokat (HANSEN et al. 2001, NISSEN&ARNEBORG 2003, NISSEN et al. 2003).

2.4.2 A sör

Teljesen más a helyzet a sörről. VERACHTERT és DAWOUD (1990) által megemlített sörök közül mindössze három – a belga *lambic (gueze)* és *savas ale*, illetve a német *weissbier* – készül Európában, és talán csak az utóbbi hangzik ismerősen a magyarországi sörkedvelők számára.

Ebből is kitűnik, hogy a sör napjainkban nem az az alkoholos ital, amelyre jellemző lenne, hogy készítésében (erjesztésében) több mikroorganizmus venne részt. A sörgyártás történetének első 2 és fél évezredében ez nem így volt, de egy a dániai Carlsbergben tevékenykedő fermentációs fiziológusnak, *Emil Christian Hansennek* köszönhetően 1883 óta a sört – a kevés említett kivételtől eltekintve – egyetlen mikroorganizmussal, a sörélesztővel készítik. Hansen kidolgozott egy módszert tiszta élesztőkultúra szaporítására, ami forradalmasította a söripart. Az élesztőt *Saccharomyces carlsbergensis*-nek nevezték el és ingyen a világ rendelkezésére bocsátották (<http://info.carlsberg.com/>).

2.4.2.1 A lambic és gueze sörök erjesztésének jellemzése

A *lambic* egy spontán erjedésű ale a Brüsszel környékén fekvő Zenne térségből. A *lambic* típusú sörök savanyúak, és egyáltalán nincs bennük szénsav. Kis mennyiségű (10-20%) búzát is használnak a sör főzéséhez, amelyet azután évekig érlelnek tölgyfahordókban, ahol is az erjedés tovább folytatódik. Ritkán fogyasztják eredeti formájukban, általában *gueze*, *faro* és *gyümölcsös lambic sörök* előállításához használják őket (VERHOEF 2002).

A *gueze* Brüsszel tipikus lambic ale-je, amely a régi és az új lambic sörök keverékéből készül. Ez egyesíti magában a fiatal lambic ale élénkségét, a régi karakteres ízével. Az alkoholtartalma 5% körüli. A *gueze* igazi ínycsoki sör (VERHOEF 2002).

Tehát a lambic az erjesztett (spontán erjesztéssel!) sör, és a *gueze* belőle származik úgy, hogy a lambic sört másodlagos erjesztésnek vetik alá palackban. A spontán erjesztést végző mikroorganizmusok akkor kerülnek a sörlébe, amikor azt – a komlóforralást követően – egy éjszakán át nagy sekély kádakban hűtik. Vizsgálatok kimutatták a lambic sörre jellemző mikroorganizmusokat a sörgyár levegőjéből is. Az erjesztés a már említett fahordókban folytatódik, és akár két évig is eltarthat. A palackban végzett másodlagos erjesztés további 6 hónapot vesz igénybe (VERACHTERT és DAWOUD 1990).

VERACHTERT és DAWOUD (1990) közli egy 1976-ban megjelent cikk eredményeit a *gueze* mikrobiológiai jellemzéséről. A szerzők két sörgyárban vizsgáltak lambic söroket, végigkísérve azok erjedését. Az erjedést különböző mikrobafajok egymásutánisága jellemzi. A spontán fermentáció *Enterobacteria* gyors szaporodásával indul, ami 30-40 nap elteltével teljesen kipusztul. Ugyanekkor néhány élesztő is kimutatható. Ennek a „baktériumos fázisnak” a végén a főerjedés kezdődik meg, amit élesztők végeznek, és néhány hónapig tart. Ezt a fázist egy olyan időszak követi, amit a tejsavbaktériumok gyors növekedése jellemez. Végül az utolsó időszakban a tejsavbaktériumok jelenléte fennmarad, ám az ekkor kimutatható élesztők már az aktidion rezisztens fajok közé tartoznak, és legtöbbjük a *Brettanomyces* nemzetséghez sorolható. A tejsavbaktériumok által jellemzett fázisban az ecetsavbaktériumok száma is megnő, de később ezek elpusztulnak. A jelenlévő tejsavbaktériumok mindig *Pediococcusok* voltak.

A palackozást követően is folytatódottak a vizsgálatok. Két mikroorganizmus csoportot találtak jelentősnek: az aktidion rezisztens élesztőket (*Brettanomyces*) és a tejsavbaktériumokat. Az előbbieket 10 hónapig voltak jelen egyre csökkenő koncentrációban, az utóbbiak viszont a palackban erjesztés során végig (14 hónapig) közel azonos mennyiségben kimutathatók voltak. Említésre méltók még az ecetsavbaktériumok, amik 3-4 hónapig voltak jelen, konstans mennyiségben.

2.5 SEJTEK RÖGZÍTÉSE ÉS A RÖGZÍTÉS FIZIOLÓGIAI HATÁSA.

RÖGZÍTETT SEJTEK IPARI ALKALMAZÁSAI

A mikroorganizmusok saját természetes környezetükben komoly változásokat is képesek túlélni. Egy ilyen környezetben a sejteknek tudniuk kell alkalmazkodni, különben elpusztulnak. A túlélés egyik formája, hogy a sejtek felületekhez vagy egymáshoz tapadnak. Ebben a formában jobban védve vannak a környezet veszélyeitől, például a nyíróerőtől vagy toxikus anyagoktól. A természetben is előforduló biofilm jó példa erre (POULSEN 1999). Következésképpen a sejtek rögzítését és a rögzített sejtek alkalmazását egy természetes jelenség emberek által való továbbfejlesztésének is tekinthetjük.

A sejtrögzítést úgy lehet definiálni, hogy az az ép sejtek fizikai bezárása vagy helyhez kötése a tér egy bizonyos, meghatározott régiójában, annak néhány kívánatos aktivitásának megőrzése mellett (WILLAERT et al. 1996).

A sejtek és enzimek rögzítésének technológiája folyamatosan fejlődött létezése első 25 évében, majd az 1990-es években elért egy szintet, ahol ez a fejlődés tetőzött. Azonban a biotechnológia bővülésének és a géntechnológia fejlődésének következtében, a sejtek és enzimek immobilizálása iránti lelkesedés újraéledt. Az elvégzett kutatások és fejlesztések a hordozók és rögzítési technikák hosszú sorát eredményezték. A bővülés jelentős részét adták azok a hasznos változások, amik egy-egy meghatározott alkalmazáshoz társíthatók (BICKERSTAFF 1997).

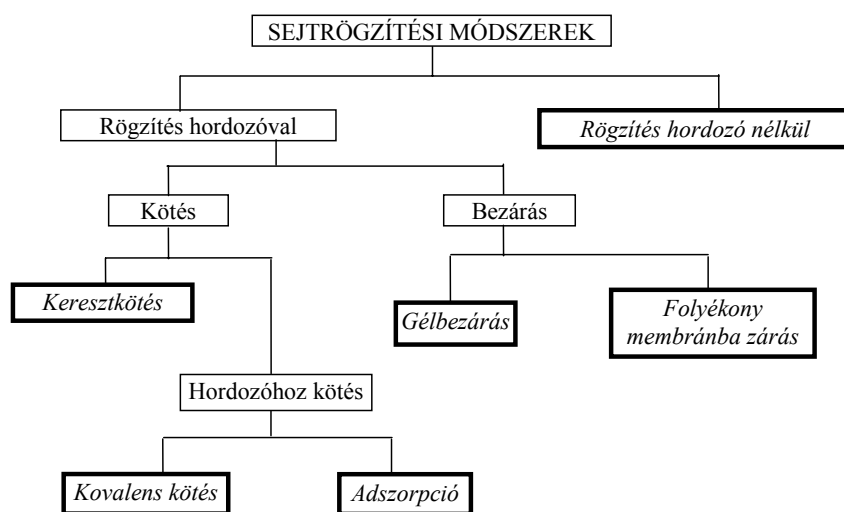
A söriparban dolgozók és kutatók is erős késztetést éreztek már a kezdetektől fogva, hogy a termelésben rögzített élesztőket alkalmazzanak. Ezt nagyban segítette, hogy az általuk használt *Saccharomyces cerevisiae* faj az egyik legkedveltebb teszt mikroorganizmus (volt) az immobilizálás hatásának tanulmányozására. Számos laboratóriumi méretekben elvégzett – sokszor sikeres – erjesztésről számoltak be a kutatók, azonban a léptéknövelés problémája sokakat eltántorított a továbblépéstől. Kitartó kutatóknak és fejlesztő mérnököknek köszönhetően már 1990 óta használnak rögzített sejtes rendszert a sörgyártás egy bizonyos folyamatában – az ászokolásban – ipari méretekben. A sörgyártók álma, hogy az erjesztés teljes egészét folyamatosá tegyék anélkül, hogy kompromisszumot kötnének a végtermék minőségét illetően, sajnos még nem valósult meg.

2.5.1 Sejtrögztési technikák

Számos sejtrögztési módszer az enzimek rögzítési technikáinak módosításával, fejlesztésével jött létre. Természetesen a sejtek nagyobb mérete befolyásolta ezeket a módszereket és számos újat eredményezett (BRODELIUS&VANDAMME 1991). A sejtek rögzítése négy alapelv szerint lehetséges:

- A sejtek egymással való keresztkötése bi- vagy multifunkcionális reagensekkel.
- Kovalens kötés előformázott hordozóhoz.
- Adsorpció előformázott hordozóhoz.
- Bezárás részecskébe, rostokba vagy mikrokapszulába.

A sejtrögztési módszerek csoportosítását a 4. ábra mutatja be.



4.ábra. Sejtrögztési módszerek

A sejtrögztési technikákat az alábbi csoportokba sorolják.

2.5.1.1 Sejtrögztés hordozó nélkül

A természetes módon aggregáló, összetapadó, pelletet alkotó vagy flokkuláló sejtek is tekinthetők immobilizált sejteknek. A folyamatot mesterségesen is elő lehet idézni kémiai anyagokkal vagy genetikai módosítással. A jelenségben kulcsszerepet játszó sejtfal régiót biológiai és környezeti tényezők is befolyásolják az anyagcserén keresztül, közvetlenül vagy közvetve (JIN&SPEERS 1998, WILLAERT et al. 1996). A mesterséges flokkulációt elősegítő szerek vagy a keresztkötést létrehozók fokozhatják/elősegíthetik az aggregációs folyamatot azon sejtek között is, amelyek természetes körülmények között nem flokkulálnak. Genetikai szinten is vizsgálták a mechanizmust, ami a flokkulációt szabályozza a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben, és 3 gént írtak le és jellemeztek (FLO1, FLO5 és FLO8). A géneket sikeresen átvitték nem-flokkuláló élesztőbe is (JIN&SPEERS 1998).

2.5.1.2 Keresztkötés

A mikroorganizmusok sejtfaa szabad amino- és/vagy karboxil-csoportokkal rendelkezik. Keresztkötés könnyen kialakítható ezek között olyan bi- vagy multifunkcionális reagensekkel, mint a glutáraldehid vagy a toluén diizocianát. A mikrobacejtek rögzíthetők ionos keresztkötéssel is úgy, hogy polielektrolitok hozzáadásával flokkulációt váltanak ki. Önmagában ritkán alkalmazzák ezt a rögzítési módszert, viszont gélbezárással kombinálva stabilabbá teszi a gél szerkezetét (BRODELIUS&VANDAMME 1991).

2.5.1.3 Kovalens kötés

A sejt rögzítése kovalens kötéssel egy hordozóhoz lehetséges (1) a mátrixon található reakciós csoporton keresztül vagy (2) egy vegyület segítségével, ami a sejtet a hordozóhoz köti. Ez utóbbira példa lehet a BrCN aktivált cellulóz vagy a glutáraldehiddel kombinált zselatin. Ugyan az irreverzibilis kovalens kötéssel rögzített sejteket tartalmazó rendszerben nincs korlátozva a diffúzió (mint gélbezáráskor), és kevésbé van kitéve az új sejtek kiáramlásának (mint adszorpció esetén), ám az összekötést biztosító vegyületek legtöbbször rendkívül mérgezőek és károsítják a sejteket (BRODELIUS&VANDAMME 1991).

2.5.1.4 Adszorpció

Ennek a rögzítési módszernek legfőbb vonzereje az, hogy egyszerű és gyorsan kivitelezhető. Ez részben annak is köszönhető, hogy a mikroorganizmusoknak természetesen is hajlama van arra, hogy valamely felülethez kötődjenek. A kötődést befolyásolja a sejtet körülvevő oldat pH-ja, a sejt fiziológiai állapota, a sejt típusa és annak környezete is. Használatakor figyelembe kell venni, hogy a sejtek és az oldat között válaszfal nincs, állandó a sejtek leválása (és újrarögzülése), ezért nem megfelelő olyan alkalmazásban, ahol a rendszerből kiáramló oldatnak sejtmentesnek kell lennie (KLEIN&ZIEHR 1990, WILLAERT et al. 1996, BICKERSTAFF 1997). Az adszorpciós rögzítéshez használt hordozóknak két nagy csoportja van: a *szerves* és a *szervetlen adszorpciós hordozók*. Tipikus szerves adszorpciós hordozók az ion-cserélő gyanták (szintetikus polimerek), a cellulóz származékok és a lektinek. Gyakran alkalmazott szervetlen hordozó a porózus üveg és a kerámia, de a szerves hordozók csoportja is igen széleskörű: rögzíthetnek sejteket faforgácsra, kovaföldre, PVC-re, DEAE-cellulózra (BRODELIUS&VANDAMME 1991).

2.5.1.5 Gélbezárás

Egyszerűsége és kiváló sejtviisszatartó képessége miatt a gélbezárás módszere az egyik legtöbbet alkalmazott sejt-rögzítési technika. A bezárt sejtek nagy sűrűséget érhetnek el a mátrixban és a sejtek jól védettek a nyíróerőtől. Számos természetes és szintetikus polimer alkalmas arra, hogy hidrofil mátrixszá gélesedjen, és olyan kíméletes körülmények között tegye ezt, ami a lehető legkisebb

sejtkárosodással jár (5. táblázat). A szintetikus polimerek mechanikai stabilitása és élettartama lényegesen jobb, mint a természetes polimereké. Ezzel szemben a sejtek növekedése és a széndioxid képződés könnyen tönkreteszi a természetes géleket. Megerősítésük lehetséges más anyagokkal, pl. keresztkötések létrehozása glutáraldehiddel vagy akár a gél részleges kiszáritása révén. (WILLAERT et al. 1996, BICKERSTAFF 1997, KOURKUTAS et al. 2004).

5.táblázat Sejtek gélbezárásos rögzítésére alkalmas módszerek (BRODELIUS&VANDAMME 1991)

GÉL KIALAKULÁSÁNAK MECHANIZMUSA	POLIMER	POLIMER TÍPUSA
Polimerizáció	Poliakrilamid, polimetakrilát	szintetikus polimerek
Keresztkötés	Különböző prepolimerek, fehérjék	szintetikus polimerek
Polikondenzáció	Poliuretán, epoxi gyanta	szintetikus polimerek
Gélesedés hő hatására	Kollagén, zselatin, agar/agaróz, κ -karragén	természetes polimerek
Ionotróp gélesedés	Alginát, kitozán	természetes polimerek
Kicsapódás	Cellulóz, cellulóz tri-acetát	természetes polimerek

A sejtek bezárásos rögzítésére alkalmas hordozók harmadik nagy csoportja – a szintetikus és természetes polimerek mellett – a membrán reaktorok. A sejtek a porózus membrán egyik oldalán helyezkednek el és a szubsztrátum oldatot cirkuláltatják a membrán másik oldalán. A porózus membrán lehetővé teszi, hogy a szubsztrátum és a termék a sejtekhez diffundáljon. Rendkívül kíméletes rögzítési módszer.

2.5.1.6 Folyékony membránba bezárás

Ebben az esetben tulajdonképpen egy kétfázisú bezárás történik, ahol a gát, – ami immobilizálja a sejteket – egy folyadék/folyadék fázis határfelülete két nem elegyedő folyadék között (WILLAERT et al. 1996).

2.5.1.7 Komplex rögzítési eljárások

A sejtek rögzítése történhet két (esetleg három) módszer kombinációjával is, amivel kihasználható mindkét eljárás előnye. Mint a 2.5.1.2 fejezetben említettem a keresztkötéses rögzítést csak másik immobilizálási módszerrel kombinálva alkalmazzák. Több módszer együttes használatának hatékonyságát jelzi, hogy az első ipari méretű, immobilizált sejteket tartalmazó, sör ászokolására alkalmas rendszerben is ezt alkalmazzák: a *Spezyme* hordozó DEAE-cellulóz-polisztirol-TiO₂-ből épül fel, a sejtek pedig ionos kötés-adszorpció-fémkelát képződés kombinációjával rögzülnek.

Leggyakoribb komplex eljárások:

- flokkulálás + adszorpció,
- telepképzés (kolonizáció) porózus adszorbensen,
- fotokatalitikus polimerizáció (keresztkötés) + gélbezárás,
- adszorpció + keresztkötés,
- ionos kötés + adszorpció + fémkelát.

2.5.2 *A hordozóval szembeni elvárások*

Rögzített sejtes rendszerben való használathoz a hordozó az alábbi feltételeknek feleljen meg:

- A hordozó legyen könnyen kezelhető és regenerálható (NORTON&D'AMORE 1994).
- A hordozó tegye lehetővé a szubsztrátumok, termékek, kofaktorok és gázok szabad áramlását (KOURKUTAS et al. 2004).
- A hordozó tartsa meg a jó mechanikai, kémiai, biológiai és hőstabilitását; enzimek, oldószerek, nyomásváltozások vagy a nyíróerő ne károsítsa könnyen (KOURKUTAS et al. 2004).
- A hordozó és a rögzítési technika legyen egyszerű, költséghatékony és léptéknövelhető (KOURKUTAS et al. 2004).
- A hordozó anyaga nem lehet toxikus. A hordozó legyen élelmiszer minőségű, ne befolyásolja a termék minőségét visszamaradt anyagokkal, és a fogyasztó is fogadja el (KOURKUTAS et al. 2004, NORTON&D'AMORE 1994).

2.5.3 *Az immobilizálás előnyei és hátrányai*

A rögzítés előnyeinek számbavételekor számos olyan tulajdonságot fedeztem fel, ami – véleményem szerint – szükséges volt ahhoz, hogy a kutatóknak felkeltse az érdeklődését, ami miatt úgy gondolták, hogy érdemes foglalkozni a sejtek immobilizálásával. Ezeket (A, B, C, E) lehet ún. elsődleges előnyöknek tekinteni. A további előnyöket és a hátrányokat olyan szempontnak vélem, amelyek már a kezdeti kutatások után, az alkalmazások során merültek fel, és amelyeket másodlagos előnyöknek lehet tekinteni (D, F, G, H, I).

A sejtrögzítés előnyei (DERVAKOS&WEBB 1991, PILKINGTON et al. 1998, WILLAERT et al. 1996)

A. Az élő vagy növekvő sejtek képesek arra, hogy olyan összetett szerkezetű anyagcsere-termékeket állítsanak elő szervezett reakciók sorával, amelyet izolált enzimek kombinációjával nem lehetséges katalizálni.

B. A rögzített élő sejtek képesek arra, hogy a hordozó anyagban vagy annak felszínén szaporodjanak, és a sejtben található katalitikus rendszerek regenerálódjanak.

C. Fokozott biológiai stabilitás. Ellenállóbbak a pH változással és a gátlószerekkel szemben.

D. A nagy sejtkoncentráció és a nagy hígítási fokkal működő folyamatos fermentáció együttesen csökkentheti a mikrobiális fertőzés veszélyét, illetve a sejtek kimosódását, valamint nagyobb termékhozamot eredményez.

E. A rögzített sejt-aggregátumon belül előforduló sejtek közelsége fontos tényező, mert olyan körülményeket teremt, ami sejtdifferenciálódáshoz és a sejtek közötti kommunikációhoz vezet, ezáltal elősegíti a másodlagos anyagcsere-termékek keletkezését nagy hozammal.

- F. Javuló anyagátadás.
- G. A rögzítés lehetőséget ad arra, hogy a reaktoron belül lokálisan elkülönítsenek különböző mikroba populációkat.
- H. A rögzített sejteket egyszerű elválasztani a reakcióközegtől.
- I. A genetikailag módosított immobilizált sejtek plazmid megtartó képessége javul.

A sejtrögzítés hátrányai (DERVAKOS&WEBB 1991, WILLAERT et al. 1996)

- J. Mechanikai problémák: (1) gázfázis képződése a részecskék között, (2) sejtek túlnövekedése, (3) a mátrix mechanikai stabilitása, (4) sejtek kiszabadulása a hordozóból.
- K. Megnövekedett szubsztrátum limitáció.
- L. Megnövekedett termékgátlás.
- M. Gazdaságosság. A legtöbb rögzítési módszer túl költséges ahhoz, hogy nagyléptékű feldolgozásban alkalmazzák.

2.5.4 A rögzített sejtek fiziológiája

A rögzített sejtek módosult anyagcseréjéről szóló kísérleti eredmények azt fogalmazzák meg, hogy az immobilizálás hatással lehet a sejt működésének biokémiájára és a sejt növekedésére (DORAN&BAILEY 1986). A témában megjelent műveket tanulmányozva (elsősorban tudományos folyóiratokban megjelent cikkeket, kisebb részben könyveket) úgy tűnik, hogy ez az a megállapítás, amivel minden kutató egyet ért. A kutatási eredmények azonban ellentmondásosak.

DE BACKER és munkatársai (1996) azt írják, hogy a rögzített sejtek viselkedése és azok anyagcseréje legtöbb esetben csak a mikrokörnyezettől függ, nem pedig a felülethez való kapcsolódástól vagy a hordozóba való bezáródástól. (A mikrokörnyezetet úgy definiálja, hogy az a sejt közvetlen környezete, ami az anyagátadás korlátozás vagy más akadály eredménye, és lehet akár létező, akár szándékosan létrehozott.) Az állítást alátámasztandó több kutató által publikált munkát is idéz (Karel és munkatársai, illetve Rouxhet és Mozes 1990-es közleményeit). Ennek a felvetésnek viszont ellentmond DORAN&BAILEY már 1986-ban megjelent cikke, amely a rögzítés hatását elemzi. Azzal a legtöbb kutató egyet ért, hogy az immobilizálás csökkenti az élesztősejt szaporodási rátáját és a sejthozamot. A szerzők szerint ennek egyik oka lehet az, hogy a hordozóhoz való kapcsolódás gátolja a sarjak kiemelkedését. Továbbá, lehetséges, hogy az élesztősejtek kapcsolódása a hordozóhoz (esetükben zselatinnal bevont gyöngyök), akadályozza azokat a sejtben lejátszódó folyamatokat, amelyek normálisan a sejtfalnál történnek a sarj kiemelkedését előkészítendő. Ilyen folyamat például a mikrotubulusok és membránhoz kötött hólyagok felhalmozódása. Ezek a hatások legalább részlegesen felelőssé tehetőek az alacsonyabb szaporodási sebességért és sejthozamért, amit a szerzők az általuk végzett vizsgálatokban is

tapasztaltak. Ezenkívül azt is megfigyelték, hogy a sarjadzó sejtek aránya kisebb volt a rögzített populációban.

Szintén ellentétes álláspontot képvisel HAHN-HÄGERDAL (1990), aki Karelnak és munkatársainak egy 1985-ben megjelent művéből a következőket idézi: A rögzített sejt teljesítményét nem csak a mikrokörnyezet befolyásolja, de a sejt felületén lejátszódó fizikai kölcsönhatások is hatnak a sejt anyagcsere szabályozására. Ezek a kölcsönhatások mind fokozhatják, mind csökkenthetik a metabolizmust vagy annak egy részét. Ezért, a rögzítés számos paraméteren keresztül befolyásolja a sejt fiziológiáját és teljesítményét, amelyek különböző irányban hathatnak.

Hasonló éles ellentét fedezhető fel egy másik kérdésben is. DE BACKER és munkatársai 1996-ban szintén több szerzőre – köztük kiemelten Bailey-re és munkatársaira – hivatkozva írják, hogy ha a rögzítésből eltávolított sejteket újra szuszpenzióba helyezik, akkor a sejtek visszatérnek eredeti állapotukba, és az anyagcseréjük sem változik ettől maradandóan. GALAZZO&BAILEY 1990-ben publikált cikke pontosan ezzel a témával foglalkozik, és egy gondosan felépített kísérlet eredményeit közli. Szerintük a sejt élettanát több ponton is befolyásolja a tény, hogy korábban rögzített körülmények között volt, például a glükóz felvevő képességét, az etanol termelését, a sejtmembrán áteresztőképességét, és több enzim termelődését, amelyek a glikolízisben vesznek részt. Arra is rámutatnak, hogy ezek a változások genetikai szinten válhatnak ki reakciókat, ami valószínűsíti, hogy hosszútávon is hatásuk lesz a sejt működésére.

Az ellentétes vélemények egy része valószínűleg a tudomány haladásának tudható be, hiszen a témában évek óta folyamatosan kutatások zajlanak. A vizsgálati és analitikai módszerek fejlődése révén akár a korábbiakkal ellentétes eredmények is szülehetnek. Az eredmények értelmezését az is nehezítheti, hogy viszonylag kevés az olyan vizsgálat, ami *kifejezetten és célzottan* az élesztősejt (vagy más mikroorganizmus sejtjének) fiziológiájára irányul. Jellemzőbbek az olyan munkák, amelyekben az élesztősejtet (vagy más mikrobát) rögzítik, hogy valamilyen vegyületet termeltesse vagy átalakítsanak vele, és csak mellékesen vizsgálják azt, hogy milyen élettani változások lépnek fel ennek hatására.

2.5.4.1 Sejtszaporodás

Valószínű, hogy a sejtszaporodás, illetve annak sebessége a rögzített sejt rendszer leggyakrabban tanulmányozott anyagcsere paramétere. Számos ellentmondó eredmény jelent már meg, amelyek csökkenő, változatlan vagy növekvő szaporodási sebességet jeleznek a rögzítés hatására, összehasonlítva egy szabadsejtes rendszerrel. Az 6. táblázatban erre mutatok be néhány példát, közöttük rögzített *Saccharomyces cerevisiae* sejtekre vonatkozó eltérő eredményeket.

6.táblázat A rögzítés hatására bekövetkező változások a specifikus növekedési sebességben vagy a generációs időben *S. cerevisiae* és más mikroorganizmusok esetében (JUNTER et al. 2002)

MIKROORGANIZMUS SZUBSZTRÁTUM	A RÖGZÍTÉS TECHNIKÁJA	SZAPORODÁSI PARAMÉTEREK	VÁLTOZÁS	HIVATKOZÁS
<i>S. cerevisiae</i> glükóz	Gélbezárás keményítővel szilárdított zselatin korongon	$\mu_{sz} = 0,50 \text{ h}^{-1}$ $\mu_r = 0,35 \text{ h}^{-1}$	↓	PARASCANDOLA & DE ALTERIIS 1996
<i>S. cerevisiae</i> glükóz	Gélbezárás Ca-alginát gyöngybe	$\mu_{sz} = 0,41 \text{ h}^{-1}$ $\mu_r = 0,25 \text{ h}^{-1}$	↓	GALAZZO & BAILEY 1990
<i>S. cerevisiae</i> glükóz	Gélbezárás Ca-alginát gyöngybe	$\mu_{sz} = 0,31 \text{ h}^{-1}$ $\mu_r = 0,30 \text{ h}^{-1}$	=	WILLAERT & BARON 1993
<i>S. bayanus</i> glükóz	Gélbezárás κ -karragenát gyöngybe	$\mu_r > \mu_{sz}$	↑	TAIPA et al. 1993
<i>Escherichia coli</i> laktóz	Gélbezárás Sr-alginát gyöngybe	$\mu_{sz} = 0,315-0,440 \text{ h}^{-1}$ $\mu_r = 0,188-0,336 \text{ h}^{-1}$	↓	INANÇ et al. 1996
<i>Chlorella vulgaris</i>	Gélbezárás karragenát gyöngybe	$\mu_{sz} = 0,362 \text{ h}^{-1}$ $\mu_r = 0,397 \text{ h}^{-1}$	=	LAU et al. 1998
<i>Bacillus subtilis</i> tápleves	Gélbezárás κ -karragenát gyöngybe	$t_{gsz} = 35 \text{ min}$ $t_{gr} = 20 \text{ min}$	↑	BAUDET et al. 1983

μ_r : rögzített sejt specifikus növekedési sebessége; μ_{sz} : szabad sejt specifikus növekedési sebessége
 t_{gr} : rögzített sejt generációs ideje; t_{gsz} : szabad sejt generációs ideje

A legnyilvánvalóbb magyarázatok a szaporodási sebesség csökkenésére (1) a rögzített sejtes rendszerekben tapasztalható korlátozott anyagátadás (SANTOS-ROSA et al. 1989, PARASCANDOLA&DE ALTERIIS 1996), (2) a tápanyag-hiányos belső részekben tapasztalható csökkent növekedés (OMAR 1993), (3) az ozmotikus nyomás vagy (4) a vízkaktivitás változása (SHREVE&VOGEL 1993, INANÇ et al. 1996).

Figyelemre méltók DORAN és BAILEY (1986) megfigyelései is, akik olyan körülmények között végezték vizsgálataikat, ahol az anyagátadás nem volt korlátozva. Ők a hordozót teszik (részben) felelőssé a sarjadzást fizikai gátlása miatt. Továbbá, - ahogy azt már ennek a fejezetnek a bevezetőjében is említettem – az élesztősejtek kapcsolódása a hordozóhoz (esetükben zselatinnal bevont gyöngyök), akadályozza azokat a sejten lejátszódó folyamatokat, amelyek normálisan a sejtfalnál történnek a sarj kiemelkedését előkészítendő.

A szaporodási sebesség növekedését is többen megfigyelték, és ennek okára is vannak elképzelések. Ezek között szerepel (1) a fizikai védelem a nyíróerő ellen (CHUN&AGATHOS 1991), (2) a kémiai hatások elleni védelem (karragenát gélben) (TAIPA et al. 1993), (3) a növekedési faktorok visszatartása, (4) az alacsony koncentrációban jelenlévő szubsztátumok jobb elérhetőségének javulása, illetve (5) gátló szubsztátumok lokális koncentráció-növekedésének akadályozása (CHEN&HUANG 1988, WILSON&BRADLEY 1997).

2.5.4.2 Anyagcsere-termékek képződése

Több beszámoló látott napvilágot arról, hogy a rögzítés hatására a sejtek metabolizmusa aktívabbá válik. A rögzített sejtek megnövekedett produktivitásáról szóló munkákat azonban óvatosan kell tanulmányozni, mert gyakran a sejtszámot nem elég figyelmesen állapítják meg, és a látszólagos aktivitás javulás inkább a mikrobiális növekedésnek tulajdonítható. Néhány jobban átgondolt

tanulmány különbséget tesz a sejtszaporodás hatása és az anyagcsere sebességének valódi fokozódása között. Mindazonáltal a metabolitok szintézisének vagy a szubsztrátum felhasználásának nagyobb specifikus sebességét rögzített sejtek esetében többen is sikeresen mutatták és bizonyították be (DORAN&BAILEY 1986).

Rögzített sejtekkel számos anyagcsere-terméket elő lehet állítani, például enzimet (KLINGEBERG et al. 1990, PASHOVA et al. 1999), antibiotikumot (CHUN&AGATHOS 1991, ASANZA TERUEL et al. 1997) vagy egyéb vegyületeket (pl. ammóniát, citromsavat) (SANTOS-ROSA et al. 1989, TISNADJAJA et al. 1996).

A továbbiakban részletesen az etanol előállításának fiziológiai hátterét szeretném ismertetni. A szakirodalomban számtalan tanulmány jelent már meg arról, hogyan állíthatnak elő etil-alkoholt rögzített sejtekkel, valamint arról is, hogy a sejtek hogyan viselkednek, milyen változások tapasztalhatók a szabadsejtes rendszerekkel összehasonlítva. Az alkohol előállítás leggyakoribb szubsztrátuma a glükóz. Felvétele és sorsa a sejten belül szervesen kapcsolódik a témához, ezért ezt is itt tárgyalom.

DORAN és BAILEY (1986) kísérleteiben az etanol termelés specifikus sebessége rögzített sejtek által megközelítőleg 45%-kal volt nagyobb, mint a szabad sejtek esetében. Hasonlóan, a glicerin termelése is fokozottabb volt.

Úgy tűnik, hogy a rögzített sejtekben az Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) anyagcsere út egy vagy több enzim által katalizált lépésének sebessége növekszik. Mivel a glicerinhez vezető anyagcsere út a dihidroxi-aceton-foszfátig (DHAP) megegyezik az etil-alkohollal, így feltételezhető, hogy a változás a reakciósor első felében következik be.

Van néhány bizonyíték arra, hogy a glükóz felvétele korlátozza az erjesztési sebességet a *S. cerevisiae* élesztőben, noha a glükóztranszport mechanizmusát nem ismerjük teljes mélységében. Ha a szubsztrátum felvétele valóban sebességkorlátozó lépésként szolgál az EMP út működésében, akkor az etanol szintézisben tapasztalható növekedés – vele párhuzamos sejthozam növekedés nélkül – arra utalna, hogy a glükózt gyorsabban vette fel a sejt. Tulajdonképpen itt is ez történt. Az immobilizált sejtek közel kétszer olyan gyorsan vették fel a glükózt, mint a szabad sejtek, annak ellenére, hogy a szubsztrátum transzportját akadályozhatja az, hogy a sejtfelszín egy része a hordozóhoz kapcsolódik. A rögzített sejt sejtfalának sérülése is elősegítheti a glükóz bejutását, amint azt korábban több cikkben is leírták. Az is lehetséges, hogy a sejten belül fellépő megnövekedett glükóz igény okozza a nagyobb transzport aktivitást a rögzített élesztő sejtfalán keresztül.

A gondolatot GALAZZO és BAILEY 1989-es munkájában folytatta, ahol már kifejezetten a rögzített élesztő glükóz anyagcseréjét tanulmányozták NMR (Nuclear Magnetic Resonance) készülékkel. A ^{31}P NMR módszer lehetővé teszi, hogy a glikolízis során a sejten előforduló

foszfát-tartalmú vegyületeket feltérképeztek, mennyiségük változását kövessék. Következtetésként azt vonták le, hogy a rögzítés vagy magára a glükóztranszportra van hatással, vagy a glükóz foszforillálásra. Cikkükben arra is rávilágítanak, hogy a sejten belüli pH befolyásolja a fermentáció sebességét: az etanol és a glicerin szintézisét és a glükóz felvételét, mind a szabad, mind a rögzített sejtekben. A pH csökkenésével (5,5-ről 4,5-re) mindkét rendszerben (szabad és rögzített) növekedtek az értékek. Ugyanakkor azt is megfigyelték, hogy változás az abszolút értékekben történt, de a szabad és rögzített sejtek között fennálló arányok nem változtak.

GALAZZO és BAILEY egy 1990-es munkájukban előzetesen Ca-alginátban szaporított élesztősejtek működését vizsgálták szuszpenzióban, illetve rögzített állapotban. Szerintük az alginátban szaporított sejtekben genetikai szinten történnek változások, amelyek alapvetően megváltoztatják az anyagcsere folyamatok sebességét és szabályozását, és ennek hatása érvényesül amikor ezeket a sejteket akár szabad, akár immobilizált formában használják biokatalizátorként. Az élesztősejteknek eltérő lesz a glükóz lebontása a szuszpenzióban növekvő sejtekétől.

Az alginátban szaporított sejtek etanol termelésének sebessége kb. másfélszer nagyobb, mint a szuszpenzióban szaporított sejteké. Ez az arány akkor is érvényesül, ha különböző „előélettel” rendelkező élesztőket szabadsejtes rendszerben vagy alginát gélbe zárva vizsgálnak. Ha a két különböző módszerrel (szuszpenzióban, illetve rögzítve) felszaporított sejteket alginát mátrixba helyezik, akkor az etanol termelési sebességük mintegy 1,8-szorosára növekszik. A hatás valószínűleg szigorúan fehérjeszintű vagy metabolitok által közvetített válaszok eredménye, mert attól nem várható a sejtalkotók változása makromolekuláris szinten, hogy egyszerűen belehelyezik a sejteket egy alginát mátrixba. Ennek a két tényezőnek az együttes hatásaként azoknál a sejteknél, amiket gélbe zárva szaporítottak fel, majd újrarögzítve gélben tanulmányoztak, az etanol termelés sebessége 2,7-szer nagyobb, mint szabad sejtekkel, szuszpenzióban.

Ez az eredmény rögzített sejtekre jellemző gyorsabb glükóz felvétellel kombinálva azt jelezheti, hogy a sejtmembrán permeabilitását befolyásolja az, ha a sejteket gélbe helyezik. Ezzel összhangban van több kutató álláspontja, akik szerint a rögzítés a sejtmembrán permeabilizálásához vezet.

2.5.4.3 Sejtösszetétel (DNS-, RNS- és fehérjetartalom, tartalék szénhidrátok)

Több beszámoló is megjelent már arról, hogy mind prokarióták, mind eukarióták rögzítésekor változásokat figyeltek meg a sejtek nukleinsav tartalmában (DORAN&BAILEY 1986, KIY&TIEDTKE 1993, LYNGBERG et al. 1999).

DORAN és BAILEY 1986-ban DNS vizsgálatok eredményeképp megállapították, hogy valami egészen szokatlan dolog történik a rögzített sejtekkel. Igen meglepő, hogy szinte nincs olyan immobilizált sejt, ami haploid vagy diploid lenne. Nagy számban fordultak elő viszont olyan sejtek,

amelyek DNS tartalma 5-ször annyi volt, mint egy G1 fázisban lévő élesztősejtnek. Továbbá, a rögzített sejtek jelentős populációjának 6-, 7- vagy 8-szoros mennyiségű genomja volt.

A szerzők a jelenséget azzal magyarázzák, hogy valószínűleg a DNS szintézise már akkor újraindul, amikor még nem vált le a leánysejt az anyasejtről. Az ismeretes, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőben a sarj kialakulása elkülöníthető a DNS szintézistől és sejtmegosztódástól. Ez ahhoz a feltételezéshez vezethet, hogy a rögzítés megfiúsítja az élesztő sarjadzását egy ponton, de a DNS replikációja és a sejtfal poliszacharidjainak szintézise változatlanul megy tovább. (Hasonló történik az élesztő szferoplasztokban is, amelyek osztódni nem képesek, de folytatják a DNS, RNS és fehérjék szintézisét, és mennyiségük a kétszeresére, vagy akár 8-szorosára is növekedhet.)

A szerzők felhívják a figyelmet arra is, hogy még nem sikerült megtalálni a kapcsolatot a blokkolt élesztő sejtciklus –, amely engedi a DNS folyamatos szintézisét, de csak alkalmanként engedi a sarj kifejlődését – és a fokozott glükóz fogyasztás és etanol termelés között. Noha az élesztő poliploiditás területén végzett kutatások még nem tárták fel a mechanizmust, de gyakran beszámolnak arról, hogy a poliploid törzsek kiváló fermentációs képességgel rendelkeznek.

Az immobilizált sejtekben viszont csak negyedannyi stabil duplaszálú RNS volt kimutatható, mint a szabad sejtekben. Mivel az RNS és DNS szintézishez az építőelemek ugyanabból a nukleotid prekursor készletből erednek, ezért lehetséges, hogy a rögzített sejt élénk DNS replikációja „elhasználja” azokat az RNS szintézis elől. Mindenesetre az elfogadható fehérjemennyiség fenntartását nehéz megmagyarázni, ha figyelembe vesszük az RNS mennyiségének jelentős csökkenését a rögzítést követően. A szabad sejtekkel összehasonlítva, a rögzített sejtek majdnem négyszer annyi intracelluláris poliszacharidot tartalmaztak, és minden vegyület (glükán, glikogén, mannán) szintje lényegesen magasabb volt, a trehalóz kivételével.

2.5.5 A sejtrögzítés söripari vonatkozásai

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztő már a kezdetektől fogva kedvelt mikroorganizmusa volt azoknak a kutatóknak, akik sejtrögzítéssel kapcsolatos kutatásokat végeztek. Az élesztők számos alapkutatót szolgáló kísérlet szereplői, amelyekben az immobilizált sejtek viselkedését, illetve az ilyen sejteket tartalmazó rendszerek működését, sajátosságait tanulmányozzák. Az alkalmazott kutatásokban is számos *Saccharomyces* élesztőt felhasználó technológiával próbálkoznak. Ezeknek nem elhanyagolható hányadát adják az ipari alkohol és az alkoholtartalmú italok előállításával foglalkozó munkák. Ez utóbbiak közé sorolhatók a borerjesztéssel, a malolaktikus fermentációval, almabor (cider) erjesztéssel (NEDOVIC et al. 2000), finomszesz előállítással, valamint sörerjesztéssel kapcsolatos rögzített sejtes technológiák kidolgozása.

Az első immobilizált élesztőt alkalmazó bioreaktort (Brio-Brew), amivel sört állítottak elő, 1971-ben készítették (MCMURROUGH 1995). Ebben az élesztőt kovafölddel elkeverve egy szűrő

függőleges elemeire vitték fel, és gyors sörrelőállításra volt alkalmas, bár észter és kozmaolaj tartalma kívánni valót hagyott maga után. Azóta egyre nő az érdeklődés a rögzített sejtes technológia iránt, amelyből néhány már kereskedelmileg is alkalmazhatóvá nőtte ki magát.

A sörgyártásban az alábbi területeken végeznek kísérleteket rögzített élesztősejtekkel:

- Folyamatos (fő)erjesztés és ászokolás.
- Alkoholmentes és alkoholszegény sör gyártása.

2.5.5.1 Folyamatos főerjesztés és ászokolás

A sörgyártás leghosszadalmasabb műveleti lépése az erjesztés, ami két szakaszból áll: a főerjesztésből és az ászokolásból. Ezért talán nem meglepő, hogy ezen két szakasz rövidítésének lehetősége/esélye folyamatos kutatásra és fejlesztésre ösztönzi a sörgyárakat és söripari gépgyártókat, valamint a kutatóintézeteket, egyetemeket.

A szakirodalom tanulmányozásakor arra a jelenségre lettem figyelmes, hogy míg a kutatóintézetek elsősorban a főerjesztés kérdésével – illetve néhány esetben a teljes erjesztési folyamattal – foglalkoznak, addig a sörgyárak inkább „csak” az ászokolással. Véleményem szerint ennek oka a két erjesztési szakasz fő céljai közötti különbségben rejlik. A főerjesztés során az élesztő felhasználja az erjeszhető szénhidrátokat és alkoholt termel, aroma vegyületek képződnek (észterek és magasabb rendű alkoholok). Tehát igen összetett folyamatok mennek végbe. Az ászokolás során is történnek átalakulások, amelyek a sör végső ízének, aromájának kialakulását szolgálják, de ezek közül csak egy az igazán fajsúlyos: a diacetil redukciója. Ebből következik, hogy a gyakorlatiasabb, eredmény orientált sörgyárak ez utóbbi szakasz üzemi szintű megvalósítására törekednek, és ezt már az 1990-es évek elejétől valóban sikeresen teszik.

Főerjesztés

A sejt anyagcseréjében bekövetkező változások megnehezítik a hagyományos sörgyártási folyamatok átültetését a rögzített sejtes és folyamatos műveletekre (VAN IERSEL et al. 2000). Ez a megállapítás fokozottan érvényes a sör erjesztésének első szakaszára, a főerjesztésre. A folyamat során kialakuló komplex ízprofil szoros összefüggésben áll az aminosav anyagcserével és így a sejtek növekedésével is. Valószínűleg a szabad és rögzített sejtes rendszerek növekedési anyagcsere állapota közötti különbségekből adódnak a sörök ízében tapasztalható főbb módosulások. Ezért fontos, hogy a lehető legjobban utánozzák a folyamatos erjesztés során a sejteknek azt a fiziológiai és metabolikus állapotát, ami a hagyományos szakaszos rendszerben jellemzi az élesztőket (VERBELEN et al. 2006). A levegőztetés és a hőmérséklet optimalása fontos eszköznek tűnik az íz kialakításában szerepet játszó vegyületek képződésének szabályozásában (ŠMOGROVIČOVÁ & DÖMÉNY 1999, BRÁNYIK et al. 2002). Egy alternatív megoldási lehetőség olyan genetikusan

módosított élesztő törzs alkalmazása, amely ellensúlyozza a folyamatos rendszer működése során megfigyelt izhibákat (VERBELEN et al 2006).

A 7. táblázatban felsoroltam néhány rögzített sejtes rendszert, amelyet az elmúlt 10 évben fejlesztettek ki folyamatos sörerjesztésre. Tudomásom szerint azonban jelenleg a világon egyetlen sörgyár sem alkalmaz rögzített sejtes rendszert sörerjesztésre ipari méretekben.

7.táblázat Folyamatos fő- és utóerjesztésre kidolgozott rögzített sejtes rendszerek

	HORDOZÓ	REAKTOR TÍPUS	FORRÁS
Főerjesztés	Faforgács	Töltött ágyas (2 lépcsős)	VIRKAJÄRVI (2001)
Fő- és utóerjesztés	PVA részecskék	Fluid ágyas	ŠMOGROVIČOVÁ et al. (2001)
Főerjesztés	Törköly	Fluid ágyas	BRÁNYIK et al. (2004)
Fő- és utóerjesztés	Porózus üveg	Töltött ágyas (3 lépcsős)	YAMAUCHI et al. (1994)
Főerjesztés	Kitozán gyöngyök	Fluid ágyas	UMEMOTO et al. (1998)
Főerjesztés	Kitozán gyöngyök	Fluid ágyas	SHINDO et al. (1994)

Ászokolás

Az első ipari méretű, immobilizált sejteket tartalmazó, sör ászokolására alkalmas rendszert a finnországi Sinebrychoff sörgyárban helyezték üzembe 1990-ben, amely napjainkban is működik (ENARI 1999). Az ászokoló rendszer 6-8 hétig is működtethető folyamatosan.

Az élesztősejtek Spezyme hordozóra (DEAE-cellulóz-polisztirol-TiO₂) vannak rögzítve. A főerjesztést hagyományos módon végzik, az élesztőt centrifugával eltávolítják, majd hőkezeléssel felgyorsítják az α -acetolaktát átalakulását diacetillé. Megfigyelték, hogy amennyiben a hőkezelést anaerob körülmények között végzik, az α -acetolaktát nagy része közvetlenül acetoinná alakul (PAJUNEN 1995). Ezek után a fickósör kb. 2 órát tartózkodik a töltött ágyas reaktorban. Itt a sör eléri végső erjedésfokát, és a diacetilen kívül más karbonil vegyületek is redukálódnak. A reaktorból távozó sör kevesebb, mint 10⁵ sejtet tartalmaz milliliterenként. A sört -1,5°C-ra hűtik, majd hagyományos módon kezelik és stabilizálják. A fermentor regenerálása és beélesztőzése két napot vesz igénybe. Higiéniai szempontból ez a két művelet a legkockázatosabb: a vadélesztők is hasonlóan jól kötődnek a hordozóhoz, mint a termeléshez használt törzs, és ilyenkor van leginkább kitéve a fertőzésnek a reaktor. Az ászokolást megelőző hőkezelésnek és a zárt rendszernek köszönhetően, működés közben nincs nagy esélye a befertőzésnek.

Hasonló rögzített sejtes ászokoló rendszert dolgoztak ki az Alfa Laval és a Schott Engineering cégek közösen. Az utóbbi cég biztosította a hordozót, a SIRAN[®] zsugorított porózus üvegyöngyöket. A folyamat megegyezik az előbb leírt rendszerrel (DILLENHÖFER&RÖNN 1996).

A finnországi Hartwall (SIRAN[®] hordozó) (HYTTINEN et al. 1995), illetve a braziliai Brahma sörgyár (DEAE-cellulóz hordozó) (NOTHAFT 1995) tervei közt is szerepelt a folyamatos ászokolás alkalmazása, ám az ipari méretű termelés máig nem indult meg.

Az 1990-es évek vége felé „fedezték fel” újra a faforgácsot, mint lehetséges hordozót, amelynek alkalmazása csökkentheti a rögzített élesztősejtes rendszer költségeit. Az eljárást LINKO és munkatársai szabadalmaztatták 1998-ban. 2001-ben NITZSCHE és munkatársai reformálták meg a folyamatos ászokolást. A hőkezelést, ami felgyorsítja az α -acetolaktát átalakulását diacetillé, enzimes kezeléssel váltották fel. Ennek megvalósításához egy második reaktort iktattak be, amely alginát gélbe rögzített majd több polimer réteggel bevont α -acetolaktát dekarboxiláz enzimet tartalmaz.

2.5.5.2 Alkoholmentes sör gyártása

Alkoholmentes (< 0,5% V/V alkoholtartalom) és alkoholszegény (0,5-1,5% V/V) sört számos különböző módszerrel lehet előállítani. A módszerek egyik csoportját alkotják azok, ami egy a normál sör alkoholtartalmának (1,5-8% V/V) csökkentésén alapszik. Ez dialízissal, evaporációval vagy reverz ozmózissal (KUNZE 1999, PILIPOVIK&RIVEROL 2005) valósítható meg. A másik csoportba az ún. megszakított erjesztést alkalmazó technológiák tartoznak, ami megvalósítható magas hőmérséklet (15-20°C) és rövid érintkeztetési idő (0,5-8 h) kombinálásával, illetve hosszabb kontakt idő (akár 24 h) és alacsony hőmérséklet (0-5°C) alkalmazásával (VAN IERSEL et al. 1998). Érdemes még két módszert megemlíteni, amivel ha nem is alkoholszegény, de az átlagos 4,5-5,5% V/V-nál kisebb alkoholtartalmú sört lehet előállítani. Az egyik az élesztő genetikai módosítása, amit NEVOIGT és munkatársai (2002) végeztek el: a glicerín-3-foszfát dehidrogenáz enzimet kódoló *GDPI* gén fokozott kifejeződése miatt mintegy 18%-kal kevesebb etanol képződött az erjesztés során. A másik módszer olyan speciális élesztő törzsek alkalmazását jelenti, amelyek azért termelnek kevesebb etanolt, mert nem erjesztenek maltózt, ami a sörlében legnagyobb mennyiségben előforduló erjeszhető szénhidrát (KUNZE 1999).

A megszakított erjesztések során legtöbb esetben nagy élesztősejt koncentrációt alkalmaznak ($>10^8$ sejt ml^{-1}), így egy sűrű élesztő szuszpenziót kevernek össze tömény sörlével. A megszakított erjesztés hátránya, hogy a beélesztőzéshez használt élesztő szuszpenzióknak viszonylag nagy lehet az alkoholtartalma (6,5% V/V). Különösen akkor fontos a fermentációt szigorúan szabályozni – megelőzendő a túlzott alkoholtermelődést – amikor rövid érintkeztetési idővel történik a gyártás. A sörlé és a sejtek inhomogén keveréke még olyan problémákat is okozhat, mint a csökkent ízképződés, illetve a nem egyenletes minőség az erjesztő tank egészében (VAN DIEREN 1995, VAN IERSEL et al. 1995).

Ezeknek a problémáknak az elkerülése érdekében fejlesztették ki a rögzített sejtes rendszereket. Míg egy szakaszos rendszerben az élesztő biomassza tömege általában 2%-kal növekszik, addig a rögzített sejtes rendszerben akár 15%-kal, ami a fermentációs időt tizedére csökkentheti.

A fermentációs idő csökkenése igen rövid tartózkodási időt is jelent egyben. Ez és az alkalmazott kis hőmérséklet, valamint az anaerob körülmények stresszként hatnak az élesztősejtekre, ami befolyásolja a szénhidrátok hasznosítását is. A sejtek csökkent mértékben veszik fel mind a di- és triszacharidokat (maltózt, maltotriózt), mind a monoszacharidokat. Az erjeszhető szénhidrátok kis mértékben hasznosulnak. Mindezek a tényezők együttesen eredményezik a csökkent alkoholképződést.

Van Iersel és munkatársai több éven keresztül tanulmányozták alkoholmentes sör előállítását egy 1,5 m³-es töltött ágyas reaktorban, amelyben DEAE-cellulóz hordozón rögzített élesztősejteket alkalmaztak. Átfogó munkájuk részeként vizsgálták a rögzítés hatását a sejtekre, az erjesztésre, az észter képződésre és az aldehid redukcióra.

A megszakított erjesztés alacsony hőmérsékletén, anaerob körülményei között rövid kontakt idő során az élesztősejtek redukálják a sörlé jellemző ízét okozó aldehideket. A szakirodalomban felfedezhető némi ellentmondás arról, hogy pontosan melyik vegyület okozza ezt a bizonyos sörlé ízt. Egy 1994-es cikkben BEAL és MOTTRAM a 2- és 3-metil butanalnak tulajdonítják a malátás jellegű sörléízt. VAN IERSEL és munkatársai (1995) szerint a 2- és 3-metil butanal, hexanal, heptanal aldehidek felelősek ezért az ízért, és a sörléíz megszűnését annak tulajdonítják, hogy azokat az élesztő redukálja a megfelelő magasabb rendű alkoholokká. PERPÈTE és COLLIN (1999) vizsgálatai szerint azonban egy másik aldehid, a 3-metiltiopropionaldehid (3-metional) felelős a sörléízért. A vegyület íz-érzékelési küszöbe vízben – amihez nagyon hasonló lehet alkoholmentes sörben is – mindössze 1,7 µg/l. Feltételezhető, hogy a sörélesztő redukáló tevékenysége ellenére marad annyi a kész alkoholmentes sörben, hogy abban ízhibát okozzon.

A rövid érintkezési idő egyik hátránya, hogy a gyors áramlás következtében csak kis mennyiségben képződnek a sör aromája szempontjából igen kívánatos észter vegyületek (VAN DE WINKEL&DE VUYST 1997). Az észter képződés a lipidek anyagcseréjével van összefüggésben egy közös köztes anyagcseretermék, az acetyl-KoA révén. Ennek következtében az észter képződés alacsony a növekedési fázisban, majd jelentősen növekszik a stacionárius fázisban, amikor nagy az intracelluláris acetyl-KoA koncentráció (VAN IERSEL et al. 1999). Más véleményt képviselnek MALCORPS és munkatársai (1991), akik szerint az észter képződés inkább az alkohol acetyl transferáz enzim indukciójához köthető. VAN IERSEL és munkatársai (1999) ezzel kapcsolatban azt tapasztalták, hogy az erjesztés folyamán növekedett az alkohol acetyl transferáz aktivitása és az etil-acetát és izo-amilacetát képződése, a telítetlen zsírsavak mennyisége viszont jelentősen csökkent. Mivel ez a jelenség egybeesett a szaporodási sebesség szignifikáns csökkenésével, azt a következtetést vonták le, hogy az anaerob körülmények és a telítetlen zsírsavak hiánya a sörlében korlátozza a sejt szaporodást a sörgyártás során és serkenti az acetát észterek képződését.

Az erjesztés folyamatának minél több aspektusát igyekeztek szabályozni a kívánt eredmény érdekében. A fermentáció során levegőztetési időszakokat iktattak be, és ezzel azt érték el, hogy az élesztő szaporodásához elegendő oxigént biztosítottak. Ezáltal manipulálták a sejtek fiziológiáját, így az észter képződés egyenletes lett. Ezenkívül az áramlási sebességgel és a sörlé összetételével is szabályozni lehet az ízanyagok képződését (VAN IERSEL et al. 1999).

Optimális esetben az erjesztés során kialakulnak a sörre jellemző ízek és aromák, jelentősebb mennyiségű etanol vagy mellékízt okozó vegyületek (pl. diacetil) képződése nélkül.

A 8. táblázatban összefoglaltam a legismertebb rögzített sejtes rendszereket, melyet alkoholmentes sör előállítására dolgoztak ki.

8.táblázat Alkoholmentes sör gyártására kidolgozott rögzített sejtes rendszerek

RENDSZER	SÖRGYÁRAK	HORDOZÓ	REAKTOR TÍPUS	MEGJEGYZÉSEK
Cultor-Tuchenhagen¹	Sinebrychoff (finn) Bavaria (holland)	Spezyme GDC (DEAE-cellulóz – polisztirol – TiO ₂)	Töltött ágyas	Kapacitás: 150ezer hl Működési idő: 5-7 hónap
Alfa-Laval-Schott Engineering²	Becks (német)	Siran [®] (porózus zsugorított üveg)	Fluid ágyas	
Meura-Delta³	Guinness (ír) Grolsche (holland)	Szilikon karbid rudak	Folyadék meghajtásos külső hurkos oszlopreaktor	Kapacitás: 1,2 hl Működési idő: 4 hónap

¹ VAN IERSEL et al. 1995, VAN DE WINKEL & DE VUYST 1997

² BREITENBÜCHER 1995, AIVASIDIS 1996

³ VAN DE WINKEL 1995

3 KÍSÉRLETI CÉLKITŰZÉS

A sörélesztő genetikai módosítással olyan képességek birtokába juthat, ami alkalmazásakor előnyt jelenthet a hagyományos törzsekkel szemben, különösen ha speciális – pl. rögzített sejtes – rendszerben kerül használatra. Céлом volt:

1. Killer tulajdonsággal és jó erjesztési képességgel rendelkező sörélesztő törzs létrehozása molekuláris genetikai eszközzel (protoplaszt fúzióval).
2. A killer sörélesztő plazmid stabilitásának és toxin termelő aktivitásának vizsgálata.
3. A killer élesztő rögzítése.

A sörgyártás során nem jellemző a kevert kultúras erjesztés, eltekintve néhány különleges terméktől. A belga lambic sörök spontán erjedésében van szerepe több élesztő fajnak, illetve a német Weissbier készül sörélesztő mellett baktérium alkalmazásával. Céлом volt:

4. Speciális – maltózt nem erjesztő – élesztőtörzsek (idegen élesztők) vizsgálata kevert kultúrában való alkalmazásra.
5. Kevert kultúras erjesztések tanulmányozása:
 - idegen élesztő és sörélesztő optimális arányának meghatározása kis alkoholtartalmú és sörre jellemző aroma összetételű termék előállításához

Kevert kultúra használatakor számolni kell a sejtek közötti kölcsönhatással, melynek természete akár a későbbi termék jellemzőire is hatással lehet. Céлом volt:

6. Az idegen élesztő és a sörélesztő kölcsönhatásának tanulmányozása.

Végül a munkám során kapott eredményeket alkoholszegény termék erjesztési eljárásnak modellezésére használtam fel. Céлом volt:

7. Módosított erjeszhető szénhidrát tartalmú sörlé készítése különböző típusú maláták felhasználásával, módosított cefrézési eljárással.
8. Idegen élesztő és sörélesztő kevert kultúras erjesztésben való alkalmazása
9. Rögzített killer sörélesztő és hagyományos sörélesztő erjesztési képességeinek vizsgálata és összehasonlítása folyamatos fermentációs rendszerben.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 FELHASZNÁLT ANYAGOK

4.1.1 Élesztőtörzsek

A protoplaszt fúzióhoz az alábbi sörélesztő törzsek közül szelektáltam. A törzsek a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből, Budapest (NCAIM, KE), valamint a Budapesti Corvinus Egyetem Sör- és Szeszipari Tanszékének gyűjteményéből származnak.

1. *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM 801
2. *Saccharomyces cerevisiae* KE 216
3. *Saccharomyces cerevisiae*(syn. *logos*) NCAIM 1223
4. *Saccharomyces carlsbergensis* NCAIM 843
5. *Saccharomyces carlsbergensis* NCAIM 846
6. *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM 546
7. *Saccharomyces carlsbergensis* NCAIM 1125
8. *Saccharomyces pastorianus* NCAIM 805
9. *Saccharomyces cerevisiae* Borsodi B
10. *Saccharomyces cerevisiae* BB Brau
11. *Saccharomyces cerevisiae* W 34
12. *Saccharomyces cerevisiae* W 66
13. *Saccharomyces cerevisiae* W 120
14. *Saccharomyces cerevisiae* W 129
15. *Saccharomyces cerevisiae* W 34/70
16. *Saccharomyces cerevisiae* UVAFERM

Az alábbi killer élesztőtörzseket – melyek a Budapesti Corvinus Egyetem Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék gyűjteményéből valók – a killer sörélesztők létrehozásakor használtam:

<u>Élesztőtörzs</u>	<u>Killer típus</u>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K7 [<i>Mata arg9</i> (L-A) (M-1)]	K1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 46305 (<i>Mata ade 2.5</i>)	K1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC 738	K2

A killer sörélesztők létrehozásakor és vizsgálatokor felhasznált további törzsek:

<u>Élesztőtörzs</u>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S6	szuperszenzitív teszt törzs
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 288C	marker törzs

Az alábbi élesztőtörzseket kevert kultúrák erjesztéseiben vizsgáltam. A törzsek a Münchener Műszaki Egyetem, II. Sörtechnológia Tanszékéről, Freising-Weißenstephanból származtak.

1. *Saccharomycodes ludwigii*
2. *Saccharomyces exiguus*
3. *Saccharomyces bayanus* DSM 70412
4. *Saccharomyces delbrueckii* (syn. *Torulasporea delbrueckii*)
5. *Torulasporea delbrueckii* DSM 70504
6. *Torulasporea delbrueckii* DSM 70607

4.1.2 Táptalajok

Kísérleteim során az élesztősejtek szaporításához és az erjesztésekhez 12 (m/m)% extrakttartalmú, malátából készült, komlózott sörlevet használtam, amelyet a Budapesti Corvinus Egyetem, Sör- és Szeszipari Tanszékének félüzemi sörfőző berendezésén, valamint a Dreher Sörgyárak Rt., illetve az INBEV Borsodi Sörgyár Rt. főzöházában állítottak elő. A sörleveket használat előtt 15 percig 121,5°C-on steriliztem.

Amennyiben a kísérlethez más tápközeget használtam, azt jelzem az eredmények ismertetésekor.

Munkám során az alábbi táptalajokat alkalmaztam

YEPD: 0,5% élesztőkivonat; 0,5% pepton; 1% glükóz; 1,5% agar (YEPD agar esetén)

Malátás tápközeg: 2% malátakivonat; 1% glükóz; 1% maltóz; 1,5% agar (malátás agar esetén)

Komplett tápleves: 3% szacharóz; 1% (NH₄)₂SO₄; 0,6% élesztőkivonat; 0,2% KH₂PO₄; 0,1% MgSO₄ x 7H₂O; 0,01% CaCl₂; 0,01% NaCl

Metilénkékes táptalaj pH=4,5 (1000 ml-re)

I. táptalaj komponens (500 ml): 5 g élesztőkivonat; 10 g pepton; 10 g glükóz; 15 g agar

II. Puffer komponens (500 ml): 1,21 g citromsav; 1,0975 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

Metilénkék festék: ~1 ml/1000 ml

A táptalaj két komponensét külön steriliztem, majd 50°C-ra hűtöttem. A pufferhez adtam a metilénkék festéket (amíg sötétkék színű lett), majd hozzáöntöttem a táptalaj komponensét.

Alap tápközeg szénhidrát fermentációs teszthez: 0,5% (NH₄)₂SO₄; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% MgSO₄ x 7H₂O; 1 ml Wickerham vitamin oldat; 10 mg brómkrezol bíbor indikátor.

A tápközeg pH-ját 5%-os NaOH-val semlegesre állítottam be. A vizsgált szénhidrátokat 0,5%-os koncentrációban adtam az alap tápközeghez.

Lizin agar pH=4,8 ± 0,2 (100 ml-re): 6,6 g dehidratált lizin táptalaj; 1 ml K-laktát; ~1 ml 10% tejsav (pH beállításához)

A dehidratált táptalajt vízben feloldottam, a K-laktátot hozzáadtam, majd felforraltam.

Lehűtöttem 55°C-ra, majd beállítottam a pH-ját tejsavval.

A szénhidrát fermentációs vizsgálatokban az alábbi szénhidrátokat alkalmaztam:

Glükóz, fruktóz, maltóz, maltotrióz, melibióz, raffinóz, szacharóz, laktóz és galaktóz.

A szénhidrát fermentációs vizsgálatokban a tesztcsővek légmentes zárásához Vazpar dugót alkalmaztam:

Vazpar dugó: vazelin és parafin olaj egyenlő súlyarányú keveréke, melyet hőlég sterilizálóban 140°C-on 120 percig steriliztem. Használathoz szintén hőlég sterilizálóban olvasztottam fel.

4.1.3 *Killer sörélesztő létrehozása*

Protoplaszt fúzióhoz alkalmazott oldatok

Előkezelő oldat (pH=8): 10 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA Na₂; 1% 2-merkaptoetanol

Protoplasztáló enzimoldat: 0,6 M KCl; 0,1 mg / ml litikáz

Fuzionáló oldat: 25% polietilén glikol; 0,1 M CaCl₂

Ozmotikusan stabilizált minimál táptalaj (pH=4,5): 0,5% (NH₄)₂SO₄; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% MgSO₄ x 7H₂O; 1% glükóz; 1 ml/l vitamin; 2% agar; 0,6 M KCl; 0,242 g citromsav (/100 ml); 0,2195 g Na₂HPO₄ x 2H₂O(/100 ml)

Ozmotikusan stabilizált YEPD agar: 0,5% pepton; 0,5% élesztőkivonat; 1% glükóz; 2% agar; 0,6 M KCl

0,6 M KCl oldat

0,3 M CaCl₂ oldat

A fúziós termékek molekuláris analízise

dsRNS plazmid izolálásához alkalmazott oldatok

50 mM EDTA (pH=7)

50 mM Tris (bázikus) (pH=9,3)

SET oldat (pH=7,5): 0,1 M NaCl; 10 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl

SCL oldat: 2 M LiCl; 0,15 M NaCl; 0,015 M Na₃-citrát

YEPD tápleves: 0,5% pepton; 0,5% élesztőkivonat; 1% glükóz

10 x TBE puffer (250 ml-re): 27 g Tris; 13,5 g H₃BO₃ (bórsav); 10 ml 0,5 M EDTA (pH=9)

A futtatáshoz 10 x TBE puffert 0,25 x TBE-re hígítottam

Kariotipizáláshoz alkalmazott oldatok

CPES oldat: 40 mM citromsav; 120 mM Na₂HPO₄; 1,2 M szorbitol; 20 mM EDTA; 5 mM ditiotreitól (DTT)

LMP agaróz: 55 mg alacsony olvadáspontú agaróz; 4,1 ml desztillált víz

CPE oldat: ugyanaz, mint a CPES oldat, de nem tartalmaz DTT-t és szorbitolt

S3 oldat: 0,45 M EDTA (pH=9); 10 mM Tris-HCl (pH=8); 1% szarkozilban (Na-lauril-szarkozinát); 1 mg/ml Proteináz-K

10 x TBE puffer (250 ml-re): 27 g Tris; 13,5 g H₃BO₃ (bórsav); 10 ml 0,5 M EDTA (pH=9)

A futtatáshoz 65 ml 10 x TBE puffert 2600 ml-re hígítottam (= 0,25 x TBE)

50 mM EDTA

4.1.4 Maláták

Az alábbi malátákat (Albadomu Malátagyár, Dunaújváros) használtam a sörlevek elkészítéséhez laboratóriumi körülmények között:

A **pilseni maláta** a legáltalánosabban használt maláta típus. A pilseni malátát 85°C-on aszalják, színe világos, íze nem túl intenzív. Nagy enzimaktivitással rendelkezik.

A **müncheneri malátát** 105°C-on aszalják, színe világos, íze intenzív, aromás. A müncheni maláta enzimaktivitása kisebb, mint a pilsenié. Ha 25-40%-ban használják a sörnek kellemes aromája lesz, ha 85%-ban adják hozzá, akkor tipikus barna sört eredményez.

A **karamell malátát** 120°C-on pörkölik, aminek következtében tejeskávés színű, íze kissé kesernyés. A szénhidrátok karamellizálódnak a pörkölés során, enzimaktivitással nem rendelkezik, de testességet ad a sörnek. Csak kis mennyiségben, 2,5-10%-ban adják a többi malátához.

4.2 ÉLESZTŐTÖRZSEK FENNTARTÁSA ÉS SZAPORÍTÁSA

Az élesztőtörzseket YEPD ferde agaron tartottam fenn, 4°C-on tárolva, évente 3 alkalommal átoltva.

Sejtek szaporítása lombikban: ebben az esetben 150 ml steril sörlebe (vagy YEPD táplevesbe) 2-3 kacsnyi élesztőt oltottam, majd 24 órát 100-120 rpm-mel rázatva 28°C-on szaporítottam.

Sejtek szaporítása laboratóriumi fermentorban (Biostat B): egyes esetekben nagyobb mennyiségű élesztősejtre volt szükségem (pl. rögzítéshez), ami fermentor alkalmazását indokolta. A szaporító közeg ebben az esetben komplett tápleves volt. A fermentor beoltásához ugyanilyen táplevesben, lombikban szaporított élesztő inokulumot használtam. A 2 literes fermentorban 30°C-on, 250 rpm kevertetéssel, 2 v/v/l levegőztetéssel 9-10 órán át szaporítottam a sejteket.

4.3 ÉLESZTŐTÖRZSEK SZELEKTÁLÁSA A PROTOPLASZT FÚZIÓHOZ

4.3.1 Szénhidrát fermentációs teszt

Élesztősejtek előkészítése:

A vizsgált élesztőtörzset egy éjszakán keresztül szaporítottam YEPD táplevesben, majd kb. 2 ml szuszpenziót Eppendorf csőben 5 percig centrifugáltam. A felülúszót leöntöttem, az élesztő pelletet 1,5 ml 0,85% NaCl oldattal kétszer átmostam. A sejtsuszpenziót 25°C-on inkubáltam 2 óráig, rázatva. A szuszpenziót lecentrifugáltam, a felülúszót leöntöttem, és a pelletet újra szuszpendáltam 1 ml 0,85% NaCl oldatban.

Fermentációs vizsgálat:

A tesztsövekben található táplevest 50 µl sejt szuszpenzióval oltottam be, majd 1 cm vastagon befedtem Vazpar dugóval. A tesztsöveket aerob körülmények között $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ -on inkubáltam. A növekedést az 5., 7., 10. majd 21. napon megvizsgáltam. A tápleves zavarossága növekedésre, a Vazpar dugó elmozdulása és az indikátor sárgára színeződése arra utal, hogy az élesztő megerjesztette a vizsgált szénhidrátot (gáz-, illetve savtermelődés).

4.3.2 Szaporodóképesség vizsgálat 4°C -on

A vizsgált törzseket 10^7 sejt/ml koncentrációban oltottam be 6 ml malátás táplevesbe. A tesztsöveket 4°C -on inkubáltam 13 napon át. Napi 2 alkalommal spektrofotométeren mértem a szuszpenziók optikai denzitását (OD) 600nm-en, malátás tápoldatra nullázva. A szaporodást az OD változásával követtem nyomon.

4.3.3 Agar diffúziós módszer killer toxin termelés kimutatására

A módszer arra alkalmas, hogy a felülúszóból kimutassuk killer toxin jelenlétét. Abból az élesztőből, aminek az érzékenységet vizsgáltam, egy kicsinyit fiziológiás sóoldatban szuszpendáltam. A szuszpenzió 1-1ml-jét metilénkékes táptalajra masszívan leoltottam, majd szikkadás után 7 mm átmérőjű lyukakat fúrtam.

A élesztősejteket, aminek a killer aktivitását kívántam tesztelni, 36 órán át szaporítottam YEPD táplevesben, majd lecentrifugáltam (3000 rpm, 10 min), és 200 µl felülúszót a lyukakba pipettáztam. A Petri-csészéket 23°C -on 48 órán át inkubáltam.

A módszer egy másik változatában a masszívan leoltott metilénkékes táptalajra kaccsal húztam ki az élesztőt, aminek a killer aktivitását kívántam tesztelni.

4.4 KILLER ÉLESZTŐK LÉTREHOZÁSA ÉS VIZSGÁLATA

4.4.1 Protoplaszt fúzió

A sörélesztő törzsek és a killer törzs 1 éjszakás rázatott tenyészetéből képeztem a protoplasztokat. Tíz ml sejtenyészetet lecentrifugáltam (4000 rpm, 5 min), majd 5 ml előkezelő oldat hozzáadása után 10 percig inkubáltam. A élesztő szuszpenziókhöz 0,6M KCl oldatot öntöttem és centrifugáltam (4000 rpm, 5 min). A sejtekből a protoplasztokat sejtfal lizáló litikáz enzimmal (Sigma L2524) képeztem. Az enzimoldatból 5 ml adagoltam a sejtekhez, majd 37°C -on 30 percig gyengén rázatva inkubáltam. A protoplasztokat 2000 rpm-en 10 percig centrifugálva nyertem ki, majd 0,6M KCl oldattal mostam, végül 0,3M CaCl_2 oldatban nyertem vissza. A szülői törzseket egyenlő arányban kevertem, majd centrifugálás után 0,7 ml Ca^{2+} tartalmú 25%-os Ca-PEG 4000 oldatban

szuszpendáltam, hogy elősegítsem a fúziót. A fúziós termékeket ozmotikusan stabilizált minimál (pH=4,3) táptalajon, míg a szülői sejteket ozmotikusan stabilizált YEPD agaron regeneráltam 23°C-on 1 hétig.

4.4.2 *Kariotipizálás pulzáló gélelektroforézissel*

A fentiekben leírt módon protoplasztokat képeztem a fúziós termékekből és a szülői élesztőkből. A protoplasztokat centrifugáltam (2000 rpm, 10 min), majd 0,5 ml CPES oldatba felvettem a sejteket. Hetven µl szuszpenziót, ami 10^8 protoplasztot tartalmazott összekevertem 170 µl LMP (alacsony olvadáspontú agaróz) agarózzal, és blokkformázóba pipettáztam. A blokkokat 5 percre mélyhűtőbe helyeztem, hogy megszilárduljanak, majd 1 ml CPE oldatba raktam 15 percre. Ezt követően háromszor átmostam a blokkokat 50mM EDTA-val 15 percenként. Végül S3 oldatban 2 napig 50°C-os vízfürdőben inkubáltam. Ennek leteltével háromszor átmostam a blokkokat 50mM EDTA-val 30 percenként, majd 0,5M EDTA oldatba helyeztem és hűtőszekrényben tároltam a gélelektroforézises elválasztásig.

Az elválasztáshoz kb. 3x3 mm-es darabokat vágtam a blokkokból és a fésűre ragasztottam, amit a géلكiöntőbe rögzítettem, majd az 50°C-ra termosztált gélt kiöntöttem. Dermedés után a fésűt eltávolítottam. A géltartót 10°C-os 0,25x TBE-puffert tartalmazó elektroforézis kádba helyeztem. A szeparálás paraméterei a következők voltak:

feszültség: 180 V,
időtartam: 36 óra,
szög: $115^\circ \rightarrow 95^\circ$,
pulzusidő: 120 \rightarrow 20 s,
változás: logaritmikus.

Az elektroforézis után 1 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó oldattal 15 percig festettem a gélt, majd desztillált vízben mostam. A futtatás eredményét UV fényvel megvilágítva néztem meg.

4.4.3 *dsRNS plazmid izolálása killer élesztőből*

A vizsgálathoz a killer élesztők 1 éjszakás rázatott tenyészetét használtam (30°C, 180 rpm, YEPD tápleves). Tíz ml sejtenyészetet lecentrifugáltam (4000 rpm, 5 min), majd 2 ml 50mM Na₂EDTA-val (pH=7) mostam. A sejteket 2 ml 2,5% merkaptóetanol tartalmalmú 50mM Tris-H₂SO₄ pufferben szuszpendáltam, és 15 percig inkubáltam szobahőmérsékleten. Végül centrifugálással ülepítettem a sejteket. A sejtekhez 0,5 ml SET oldatot adtam, ami 1% SDS-t és 0,5 ml redesztillált fenolt is tartalmazott. Szobahőmérsékleten 1 óráig rázatva inkubáltam. A nukleinsavakat hideg etanollal (96 v/v%) kicsapattam (15 perc inkubálás mélyhűtőben). A csapadékot ezután szárítottam, 0,5 ml SCL oldatban feloldottam, majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltam. A csapadékot centrifugálással ülepítettem, majd a felülúszóból hideg etanollal kicsapattam a nukleinsavakat,

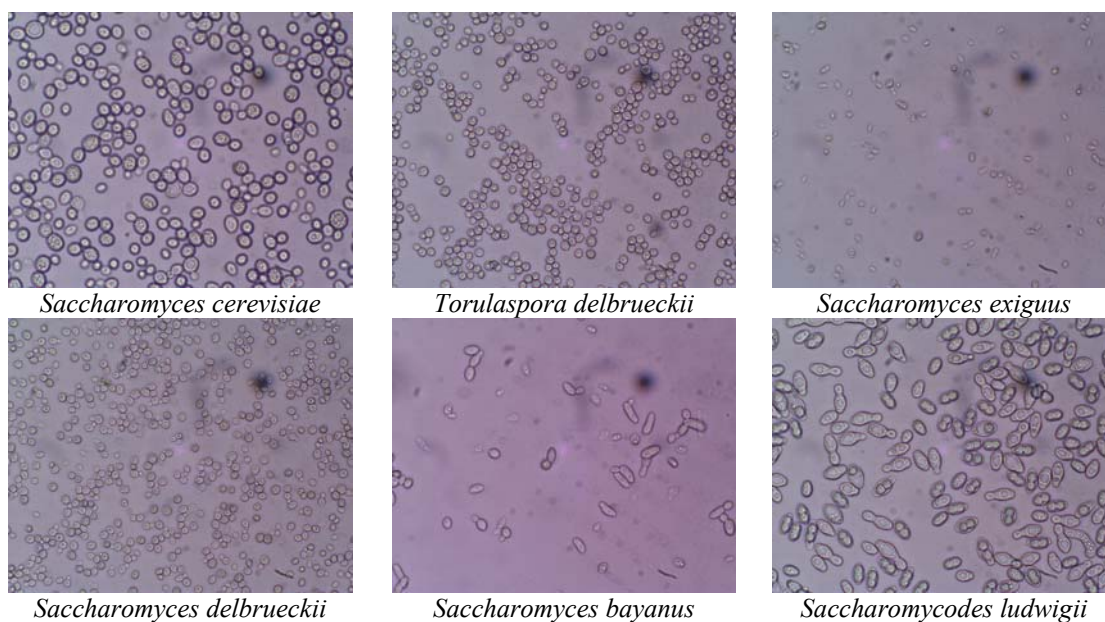
amely főként RNS-t tartalmaz. Mélyhűtőben 15 perces inkubálás után a csapadékot centrifugálással ülepittem, az etanolt pipettával leszívтам. A csapadékot 70%-os etanollal is átmostam. Végül 10 µl TE pufferben feloldottam, és 4°C-on tároltam.

Az izolált dsRNS plazmidot 1%-os agaróz gélben futtatva mutattam ki. Az elektroforézis után 1 µg/ml etidium-bromidot tartalmazó oldattal 15 percig festettem a gélт, majd desztillált vízben mostam. A futtatás eredményét UV fényvel megvilágítva néztem meg.

4.5 KEVERT KULTÚRÁS ERJESZTÉSEKKEL ÉS KÖLCSÖNHATÁSOK VIZSGÁLATÁVAL KAPCSOLATOS MÓDSZEREK

4.5.1 Sörélesztő és idegen élesztő törzsek arányának meghatározása morfológia alapján

Mikroszkópos vizsgálattal megállapítottam, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* sörélesztő és a kevert kultúras vizsgálatokhoz használt idegen élesztők morfológiai képe jelentős – méretbeli és alaki – eltéréseket mutat (5. ábra). Az élesztőknek ezt a tulajdonságát kihasználva Bürker-kamrás sejtszámlálással állapítottam meg az élesztőtörzsek arányát a kevert kultúras erjesztések során.



5.ábra. A vizsgálatokban alkalmazott élesztőtörzsek mikroszkopikus képe
(40-szeres nagyítás)

4.5.2 Lizin agar *Saccharomyces* és nem-*Saccharomyces* élesztőtörzs megkülönböztetésére

A módszer azon alapul, hogy a *Saccharomyces* törzs nem képes nőni a lizin agaron, míg a nem-*Saccharomyces* élesztő igen.

A kevertkultúrában található nem-*Saccharomyces* élesztő koncentrációja meghatározható a lizin tartalmú táptalajon. A sörélesztő koncentrációja kevertkultúrából úgy határozható meg, hogy a YEPD agaron fejlődő telepek (amin a kevert kultúrában található mindkét élesztő képes fejlődni) számából kivonjuk a lizin agaron kinőtt telepek számát (NISSEN&ARNEBORG 2003, NISSEN et al. 2003).

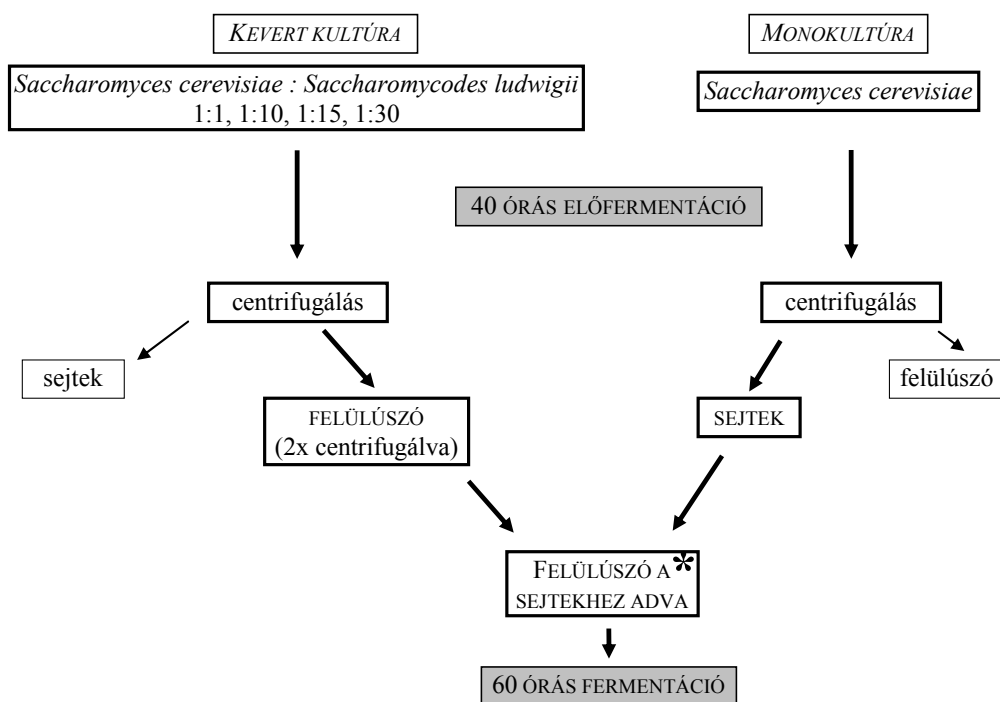
4.5.3 Kevert kultúras erjesztések

Az alkalmazott élesztőtörzseket 24 órán át rázatva (100-120 rpm) szaporítottam 28°C-on steril sörlében. A sejteket lecentrifugáltam (5000 rpm, 5 perc) és desztillált vízzel kétszer mostam. A sejteket ismert mennyiségű desztillált vízben visszaszuszpendáltam, majd Bürker-kamrával megállapítottam a sejtkoncentrációt. Ebből a szuszpenzióból a megfelelő arány beállításához szükséges mennyiséget adtam hozzá a steril sörléhez a kevert kultúras erjesztések elvégzéséhez.

Az egyes kísérleteknél alkalmazott élesztőtörzseket, sejtszámokat és arányokat az eredmények ismertetésekor adom meg.

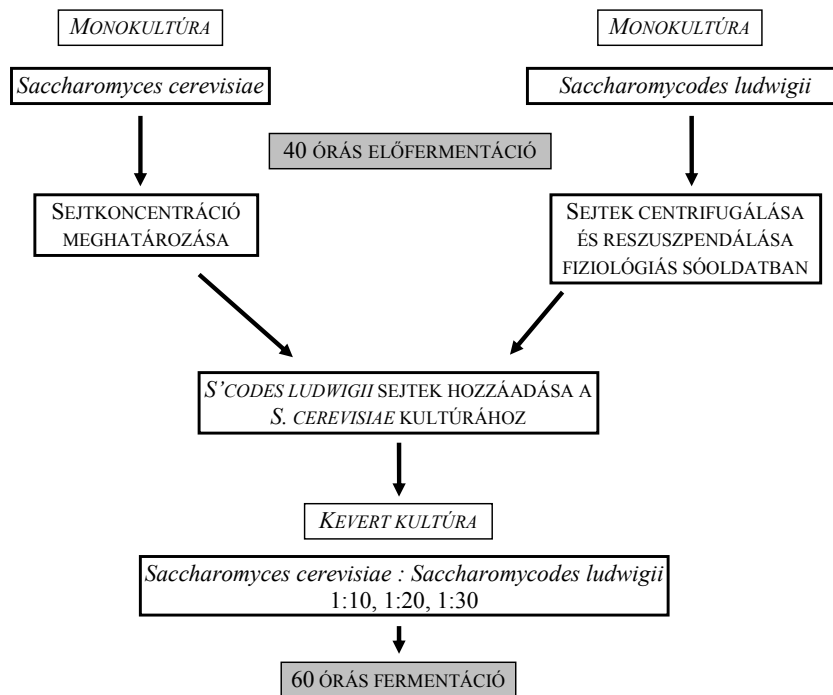
4.5.4 Két élesztőtörzs kölcsönhatásának vizsgálata

Az 6/a és b ábrán látható, két élesztőtörzs kölcsönhatását vizsgáló módszerek NISSEN és munkatársai (2003) által kidolgozott módszerek módosításai.



6/a.ábra. Kevert kultúra felülúszójának hozzáadása monokultúras sejtekhez

(*A *S. cerevisiae* sejtekhez ugyanannyi felülúszót adtam, amennyit a centrifugálással eltávolítottam.)



6/b.ábra. Élő *Saccharomyces ludwigii* sejtek hozzáadása *Saccharomyces cerevisiae* kultúrához

4.6 ALKOHOLSZEGÉNY SÖRÖK ELŐÁLLÍTÁSÁNAK MODELLEZÉSÉHEZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

4.6.1 Sörlé előállítás laboratóriumi körülmények között

A cefrőzés során a söriparban használatos koncentrációviszonyokat modelleztem. 50 g malátaőrleményt 200 ml vízzel összekevertem, majd laboratóriumi cefrőzőberendezésben folyamatos keverés (100 rpm) közben különböző hőmérsékletekre melegítettem. 52°C-on becefréztem, majd 30 perces fehérjepihenőt tartottam. Ezt követően 72°C-on tartottam a cefrét addig, amíg a keményítő lebomlott. Ezt jódpróbával ellenőriztem. A keményítő lebontása 15-20 percet vett igénybe. A sörlét ezután leszűrtem, majd 1 órás komlóforralást végeztem keserű komló (0,5 g/1000 ml sörlé 5. percben) és aroma komló (0,77 g/1000 ml sörlé 55. percben) adagolása mellett.

A malátaőrlemények különböző arányban pilseni, müncheni és karamell maláta keverékéből álltak. Az összetételeket az eredmények értékelésénél adom meg.

4.6.2 *Végerjedésfok meghatározása*

A sörlevet nagy mennyiségű *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztővel vagy *Saccharomyces ludwigii* élesztővel oltottam be, majd szobahőmérsékleten 48 órát erjesztettem. Végül megmértem az extrakttartalmát.

Végerjedésfok (%) = (eredeti extrakt – végső extrakt)/eredeti extrakt

4.6.3 *Erjesztés laboratóriumi körülmények között*

A laboratóriumi körülmények között előállított komlózott sörlét *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 és *Saccharomyces ludwigii* 1:15 arányú keverék kultúrájával oltottam be. A főerjesztés 12°C-on 7 napig, az utóerjesztés 0°C-on 14 napig tartott.

4.6.4 *Élesztősejtek rögzítése*

Az élesztősejteket gélbezárással rögzítettem Ca-alginát gélbe. A gélgyöngyök készítéséhez a hagyományos csepegtetési módszert alkalmaztam. Az élesztő szuszpenzióhoz, ami $5-10 \times 10^8$ sejt/ml koncentrációban tartalmazta az élesztőt 2,5% Na-alginátot (Sigma A-7128) adtam, majd homogenitásig kevertem. Az alginát-élesztő szuszpenzióból perisztaltikus pumpa és 0,6 mm átmérőjű injekciós tű segítségével, 2% CaCl₂ oldatba csöpögtetve, gyöngyöket készítettem. A 1,5-2,0 mm átmérője alginát gyöngyöket 30 percig kevertettem majd 0,9% CaCl₂ oldatban mostam és ebben tároltam. A gélgyöngyöket 1-2 napon belül felhasználtam.

4.7 ANALITIKAI MÓDSZEREK

4.7.1 *Aromakomponensek meghatározása gázkromatográffal*

Készülék: Perkin-Elmer

detektor: FID lángionizációs detektor (250°C) acetaldehid, dimetilszulfid, magasabb rendű alkoholok és észterek detektálására,
ECD elektronbefogásos detektor (150°C) diacetil és 2,3-pentándion detektálására.

Oszlop: kapillár elválasztó oszlop, CP-Wax 52 C.B. nedvesítéssel, 50 m x 0,32 mm.

Felhasznált gázok: ECD számára argon-metán gázkeverék a make-up gázáram, hélium vivőgáz, FID számára hidrogén make-up gázáram, szintetikus levegő vivőgáz.

Kolonnatér hőmérséklete:

75 – 85°C

A módszerrel bármilyen sör vizsgálható. Élesztős sör esetében a mintát kovafölddel meg kell szűrni és azonnal kell megmérni, vagy 0°C-ra lehűteni. A gázkromatográfiás mérések során a mintavétel Perkin-Elmer headspace mintavevővel történt.

Az automata mintavételezés paraméterei:

termosztálás 60°C-on 20 percig
nyomáskiegyenlítés 3 perc alatt
injektálás 110°C-on 1 perc alatt

Az egyes komponensek mennyiségi meghatározását a csúcs alatti területek alapján és standard egyenesek segítségével végeztem (ANALYTICA-EBC 1999).

4.7.2 Szénhidráttartalom meghatározása HPLC-vel

Készülék: Waters HPLC,
Waters 600 pumpa,
Waters automata injektor
Waters 410 RI detektor, mely működésének alapja az elválasztó oszlopból kiáramló mozgó fázis törésmutatójának mérése

Oszlop: Aminex HPX-87H töltetű oszlop, ami glükóz, fruktóz, maltóz, maltotrióz, etanol és szerves savak meghatározására alkalmas

Mozgó fázis: 0,005 M H₂SO₄

Mérés jellemzői: futtatás ideje: 20 perc
mintamennyiség: 20 µl
detektor hőmérséklete: 40°C
oszlop hőmérséklete: 50°C
áramlási sebesség: 0,6 ml/min

A mintákat mérés előtt centrifugáltam vagy redős szűrőn kovafölddel leszűrtem, szükség esetén a szén-dioxidot rázatással elűztem, végül 0,45 µm pórusátmérőjű szűrővel leszűrtem.

4.7.3 A sör paramétereinek meghatározása

A sörök erjedésfokát, alkoholtartalmát és egyéb paramétereit Centec típusú söranalizátorral határoztam meg. A termosztált, szénsavmentesített minta perisztaltikus szivattyú segítségével az Anton-Paar rendszerű ultrahangos sűrűségmérőbe, majd az átfolyó küvettás refraktométerbe jut. A sűrűség és a törésmutató értékekből a beépített szoftver kiszámítja a sör paramétereit: a sűrűséget (g/cm³), az alkoholt % (m/m), az alkoholt % (V/V), az eredeti extraktot % (m/m), a valódi extraktot % (m/m), a látszólagos extraktot % (m/m), a valódi leerjedést %, a látszólagos leerjedést %.

5 KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 KILLER SÖRÉLESZTŐ LÉTREHOZÁSA ÉS VIZSGÁLATA

Munkám egyik célkitűzése volt, hogy protoplaszt fúzióval létrehozzak egy olyan élesztőtörzset, amely sörerjesztésre alkalmas és killer toxin termelésére is képes. Egy ilyen élesztőtörzs létrehozásának legfőbb indoka az, hogy a sör erjesztésekor esetlegesen megjelenő vadélesztők ellen védelmet nyújtson, megakadályozza azok káros hatását a sör érzékszervi tulajdonságaira.

A munka első fázisában – a célnak megfelelő sörélesztők és killer élesztők kiválasztása után – protoplaszt fúziót végeztem, amelyből a killer tulajdonságot hordozó fúziós termékeket kaptam. Molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltam a fúziós termékeket, hogy megállapítsam valóban hordozza-e a sörélesztő genetikai állományát és a toxin termelésért felelős dsRNS-eket.

A következő fázisban a protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörélesztő killer karakterét tanulmányoztam. Egy ilyen törzs alkalmazásának több fontos feltétele lehet. Ezért megvizsgáltam, hogy a protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörélesztő termel-e annyi toxint, hogy annak fermentációs körülmények között is legyen hatása., Vizsgáltam továbbá, hogy milyen hőmérséklet tartományban képes kifejteni hatását a toxin. Végül, de nem utolsó sorban elengedhetetlen, hogy a killer tulajdonságért felelős dsRNS stabilan megmaradjon a sejtekben, több átoltást kibírva, hosszabb időn keresztül. A protoplaszt fúziót követően több éven át rendszeresen ellenőriztem a fúziós termékek killer aktivitását.

5.1.1 Sörélesztő törzsek szelektálása

A protoplaszt fúzió elvégzéséhez a rendelkezésemre álló 16 sörélesztő törzsből 2 lépéses szelekcióval választottam ki a kísérlet céljaira megfelelő törzseket. Elsőként a fermentációs teszttel olyan alsóerjesztésű élesztőt kívántam kiválasztani, ami jó erjesztési képességekkel rendelkezik (9. táblázat). Második lépésben megvizsgáltam, hogy mely élesztők szaporodnak jól kis hőmérsékleten (4°C). Ez a tervezett erjesztési kísérletek miatt volt fontos.

Szénhidrát fermentációs teszt

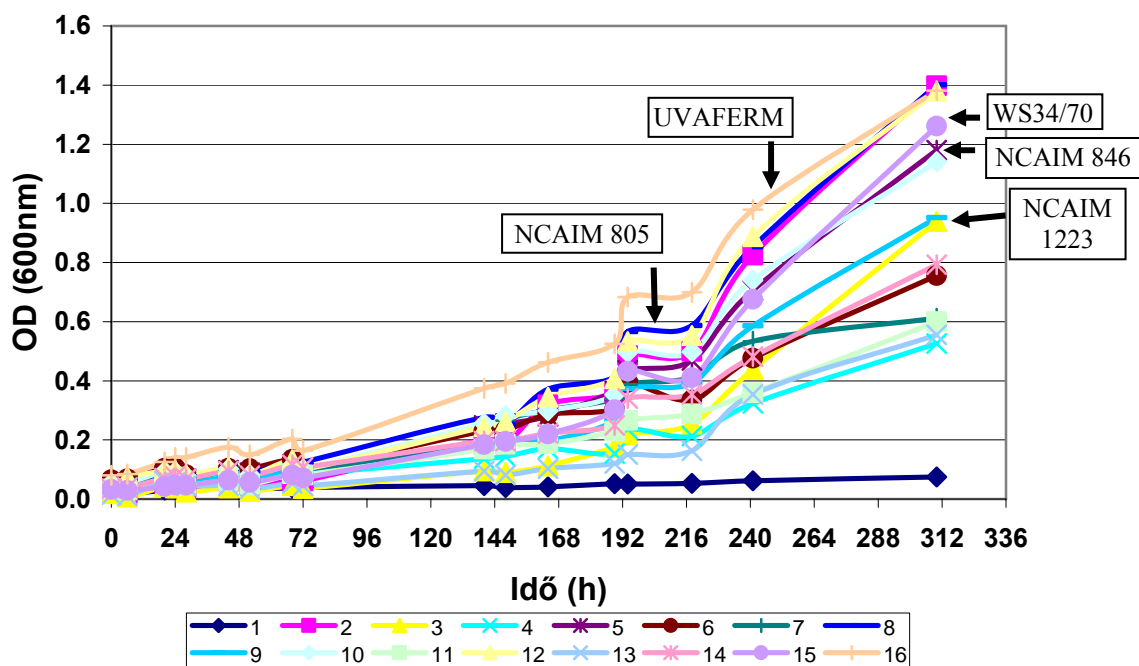
9.táblázat Sörélesztő törzsek szénhidrát fermentációs vizsgálatának eredménye

		GLÜKÓZ	FRUKTÓZ	SZACHARÓZ	MALTÓZ	MELIBIÓZ	RAFFINÓZ
1	<i>S. cerevisiae</i> NCAIM 801	++	++	++	++	+	+
2	<i>S. cerevisiae</i> KE 216	++	++	++	++	+	++
3	<i>S. cerevisiae</i> NCAIM 1223	++	++	++	++	+	+
4	<i>S. carlsbergensis</i> NCAIM 843	++	++	++	++	+	++
5	<i>S. carlsbergensis</i> NCAIM 846	++	++	++	++	++	+
6	<i>S. cerevisiae</i> NCAIM 546	++	++	++	++	-	-
7	<i>S. carlsbergensis</i> NCAIM 1125	++	++	++	++	-	-
8	<i>S. pastorianus</i> NCAIM 805	+	++	+	+	++	++
9	<i>S. cerevisiae</i> Borsodi B	+	++	+	+	++	+
10	<i>S. cerevisiae</i> BB Brau	+	++	++	++	++	+
11	<i>S. cerevisiae</i> W 34	+	++	+	+	++	+
12	<i>S. cerevisiae</i> W 66	++	++	+	++	++	+
13	<i>S. cerevisiae</i> W 120	++	++	+	+	++	+
14	<i>S. cerevisiae</i> W 129	++	++	++	++	++	+
15	<i>S. cerevisiae</i> W 34/70	++	++	+	++	++	+
16	<i>S. cerevisiae</i> Uvaferm	++	++	++	+	++	+

++: gáz- és savtermelés; +: savtermelés; -: a szénhidrátot nem hasznosította

Szaporodóképesség vizsgálata 4°C-on

A 7. ábrán látható a vizsgálat eredménye.



7.ábra. Élesztősejtek szaporodása 4°C-on

A protoplaszt fúzióhoz 5 alsóerjesztésű sörélesztő törzset választottam ki, melyeket a 9. táblázatban kiemeltem és a 7. ábrán is bejelöltem. A kiválasztott élesztők a fermentációs vizsgálat szerint jól hasznosították a szénhidrátokat, és 4°C-on kiválóan szaporodtak.

A protoplaszt fúzióhoz 3 killer élesztőtörzs állt rendelkezésemre. Mivel a protoplaszt fúzió egy későbbi lépésénél a killer élesztőre való érzékenység szelekciós tényező volt, ezért először meg kellett vizsgálnom, hogy ennek a kritériumnak melyik sörélesztő, illetve killer élesztő felel meg. A killer élesztők aktivitását úgy ellenőriztem, hogy egy ún. szuperszenzitív törzset (*Saccharomyces cerevisiae* S6) is bevontam a vizsgálatba, melyről biztosan tudtam, hogy érzékeny mind három törzs toxinjára.

A szelekció eredményét a 10. táblázat foglalja össze.

10.táblázat Sörélesztő törzsek szelektálása a protoplaszt fúzióhoz

Sörélesztő törzsek	<i>S. cerevisiae</i> K7 (K1 killer típus) [<i>Mata arg9</i> (L-A) (M-1)]	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 46305 (K1 killer típus) (<i>Mata ade 2.5</i>)	<i>S. cerevisiae</i> NCYC 738 (K2 killer típus)
<i>S. cerevisiae</i> WS 34/70	SZ	R	R
<i>S. cerevisiae</i> NCAIM 1223	R	R	R
<i>S. cerevisiae</i> NCAIM 846	SZ	R	R
<i>S. pastorianus</i> NCAIM 805	SZ	R	R
<i>S. cerevisiae</i> (UVAFERM)	R	R	R
<i>S. cerevisiae</i> S6 (szuperszenzitív)	SZ	SZ	SZ

SZ: szenzitív; R: rezisztens

A *S. cerevisiae* ATCC 46305 és NCYC 738 killer törzsekkel szemben az összes sörélesztő rezisztensnek mutatkozott. A *S. cerevisiae* K7 killer élesztő esetében szenzitivitást tapasztaltam a *S. cerevisiae* WS 34/70, *S. cerevisiae* NCAIM 846 és *S. pastorianus* NCAIM 805 törzseknél, ezért a protoplaszt fúziónál ezeket használtam fel.

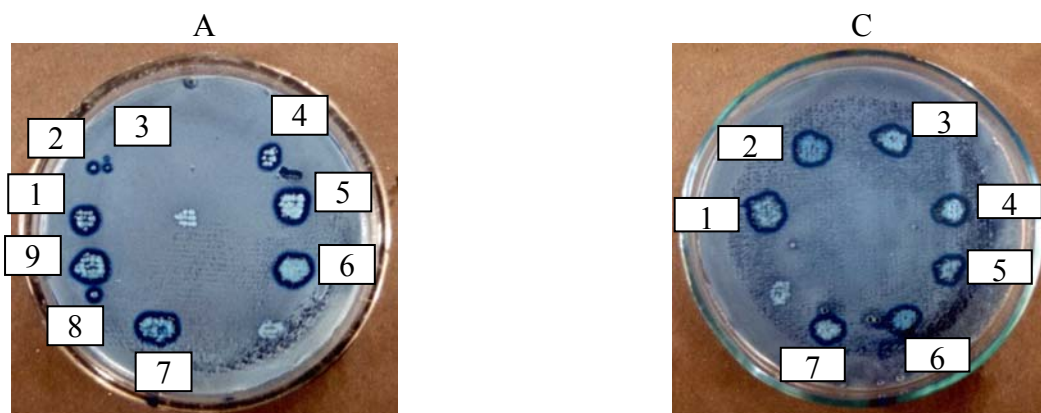
5.1.2 Killer sörélesztők létrehozása protoplaszt fúzióval

A protoplaszt fúziót az alábbi szülői párokkal végeztem el:

- (A) *S. cerevisiae* WS 34/70 + *S. cerevisiae* K7 (K1 killer típus)
- (B) *S. cerevisiae* NCAIM 846 + *S. cerevisiae* K7 (K1 killer típus)
- (C) *S. pastorianus* NCAIM 805 + *S. cerevisiae* K7 (K1 killer típus)

Utódsejteket mindhárom fúzió után sikerült regenerálni. A telepeket minimál táptalajra vittem át, amin növekedést tapasztaltam. Ez azt jelentette, hogy az utódsejtek vagy valóban fúziós termékek voltak, vagy regenerálódott sörélesztő szülői sejtek. Killer élesztő szülői sejtek nem lehettek, mert azok arginin auxotrófok voltak, tehát a minimál táptalajon nem képesek növekedni. Következő lépésben metilénkékes táptalajra replikáztam a telepeket, amelyeket előzetesen masszívan leoltottam *S. cerevisiae* S6 szuperszenzitív törzsszel. Az (A) fúzióból származó 11 telep közül 9

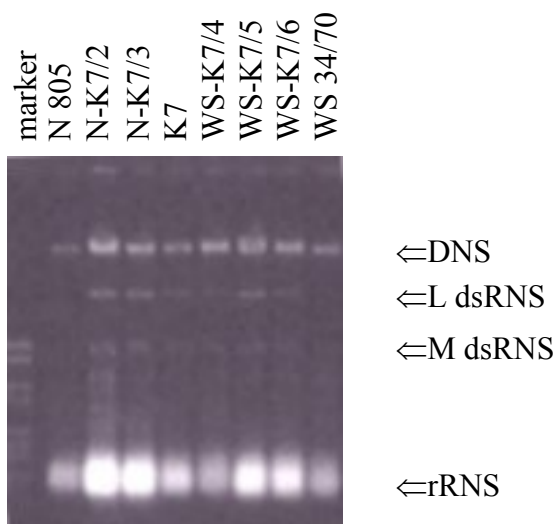
körül egyértelmű feltisztulási zóna jelent meg (8. ábra) indikálva azt, hogy ezek killer aktivitással rendelkeznek. A (C) fúzió esetében 10 telepből 7 bizonyult killernek (8. ábra), ám a (B) fúzióból nem származott killer aktivitással rendelkező telep.



8.ábra. Az A és C protoplaszt fúzióból származó termékek killer aktivitása

5.1.2.1 dsRNS plazmid izolálása killer élesztőből

A vizsgálatba a két sörélesztő szülői törzset, a killer élesztő szülői törzset, valamint az (A) fúzióból 3 fúziós terméket és a (C) fúzióból 2 fúziós terméket vontam be. Az izolált nukleinsavak elektroforetikus elválasztásának eredménye megmutatta (9. ábra), hogy a vizsgált fúziós termékek hordozzák a killer szülői élesztőből származó L és M plazmidot. Ugyanakkor a sörélesztőknél ezek – természetesen – nem voltak kimutathatók. A vizsgálat újabb bizonyítéka volt annak, hogy a protoplaszt fúzió sikeres volt, killer aktivitással rendelkező sejteket eredményezett.

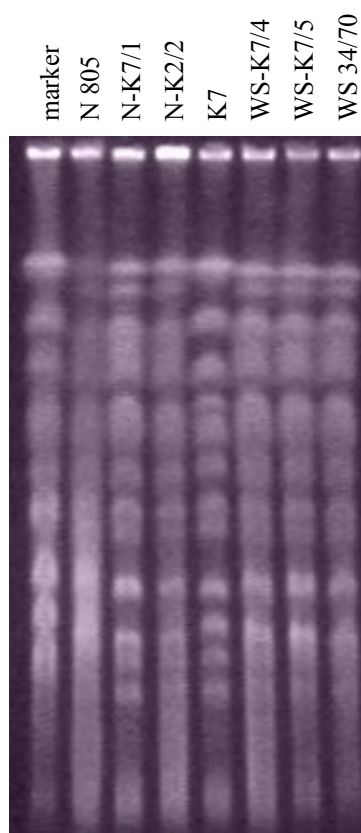


9.ábra. Szülői sejtekből és fúziós termékekből izolált dsRNS elektroforetikus elválasztása

(Sörélesztő szülők: N 805 = *S. pastorianus* NCAIM 805 és WS 34/70 = *S. cerevisiae* WS 43/70. Killer szülő: K7 = *S. cerevisiae* K7. Fúziós termékek: N-K7/2, N-K7/3 = N 805 és K7 fúziós termékei; WS K7/4, WS K7/5, WS K7/6 = WS 34/70 és K7 fúziós termékei.)

5.1.2.2 Kariotipizálás pulzáló gélelektroforézissel

Erre a vizsgálatra azért volt szükség, hogy megállapítsam, a fúzió termékei hibridek vagy cibridek voltak. Azt reméltem, hogy a kapott fúziós termékek ez utóbbi kategóriába tartoznak – tehát a kromoszómáit a sörélesztő szülőtől kapta, míg a citoplazmáson öröklődő, killer tulajdonságot kódoló dsRNS-t a killer szülőtől – hiszen ebben az esetben a sörélesztőre jellemző erjesztési képességekkel rendelkezne. Noha a nagyobb kromoszómákat nem sikerült tökéletesen elválasztani, a kariogram (10. ábra) szerint a sörélesztő szülők és a fúziós termékek kromoszóma mintázata hasonló, amelyektől viszont eltér a szülői killer élesztő mintázata.



10.ábra. Szülői sejtek és fúziós termékek kariogramja

(Sörélesztő szülők: N 805 = *S. pastorianus* NCAIM 805 és WS 34/70 = *S. cerevisiae* WS 43/70. Killer szülő: K7 = *S. cerevisiae* K7. Fúziós termékek: N-K7/1, N-K7/2 = N 805 és K7 fúziós termékei; WS K7/4, WS K7/5, = WS 34/70 és K7 fúziós termékei.)

A kariotipizálás eredménye alapján megállapítottam, hogy a vizsgált fúziós termékek cibridek voltak.

5.1.3 A protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörélesztő killer aktivitásának vizsgálata

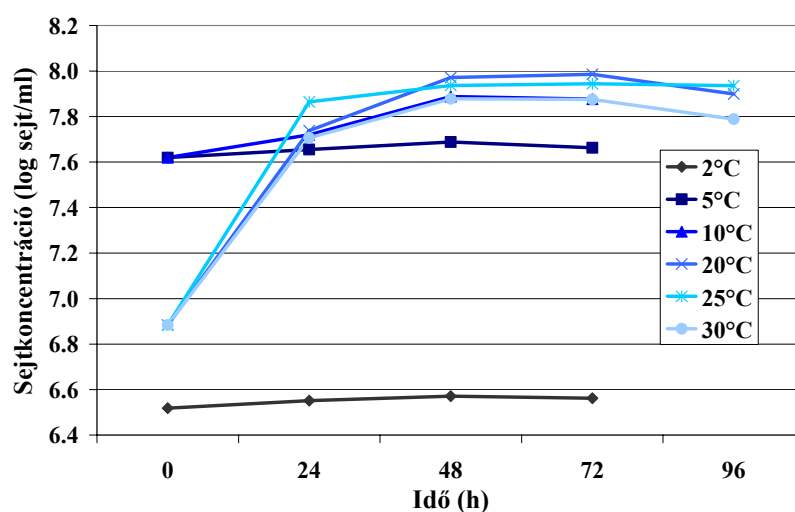
A killer sörélesztővel az alábbi vizsgálatokat végeztem el annak érdekében, hogy megállapítsam, megfelelne-e ez a törzs az iparban való alkalmazásnak.

- Több hőmérsékleten vizsgáltam az élesztőtörzs toxintermelő képességét.
- Kevert kultúras erjesztésekben azt vizsgáltam, hogy milyen érzékeny sejt – killer sejt aránynál van hatása a toxinnak.
- Vizsgáltam, hogy a protoplaszt fúzióval létrehozott törzs megtartja-e a toxint kódoló plazmidot hosszabb időn keresztül.

5.1.3.1 Toxintermelés különböző hőmérsékleteken

A killer toxin termelésének optimális hőmérséklete 23°C. Ezt a hőfokot alkalmazzák, ha egy élesztőről ki akarják deríteni, hogy rendelkezik-e killer aktivitással. A fúziós termékek regenerálását követően a toxintermelés meghatározására szintén ezt a hőmérsékletet használtam. A sörgyártás során azonban ettől eltérő hőmérsékleteket is alkalmaznak. A felsőerjesztésű sörélesztők 15-25°C-on erjesztenek, a kontinentális Európában szélesebb körben alkalmazott alsóerjesztésű sörélesztők pedig 5-10°C-on. Az ipari célra előállított killer sörélesztőnek ezen az alacsony hőmérsékleten is kell toxint termelnie.

A vizsgálatokhoz 100 ml steril sörlevet oltottam be 10^6 - 10^7 sejt/ml koncentrációban a WS K7/5 élesztőtörzssel, majd a következő hőmérsékleteken inkubáltam (rázatás nélkül): 2°C, 5°C, 10°C, 20°C, 25°C, 30°C. A szuszpenziókból 24 óránként mintát vettem a sejtkoncentrációk nyomon követésére (11. ábra). A 48 órás mintavételnél a szuszpenziókból 2 ml-t lecentrifugáltam, majd



11.ábra. Killer sörélesztő aktivitásának vizsgálata szenzitív sejtrel szemben különböző hőmérsékleteken

a felülúszóban a Módszerek fejezetben leírt módon *S. cerevisiae* S6 szuperszenzitív törzsön vizsgáltam a killer toxin jelenlétét. A módszert annyival kiegészítettem, hogy az elválasztott élesztősejtekből kaccsal kihúztam a masszívan leoltott táptalajra.

Toxin jelenlétét az agar diffúziós módszer 10 és 25°C-on való inkubáció után mutatta ki. A két legalacsonyabb vizsgált hőmérsékleten csak minimális sejt szaporodást tapasztaltam, és valószínű, hogy a sejt a lelassult metabolizmus miatt toxint sem termelt. A legmagasabb hőmérsékleten, 30°C-on a toxin hőérzékenysége miatt kaphattam negatív eredményt (12. ábra).



12.ábra. Az agar diffúziós módszer eredménye különböző hőmérsékleten

5.1.3.2 Kevert kultúras toxinvizsgálatok

Természetes körülmények között a killer élesztő által termelt toxinnak először el kell jutnia az érzékeny élesztőhöz, hogy kifejtsen hatását. Azok a módszerek, amivel laboratóriumi körülmények között bizonyítják, hogy egy élesztő killer toxint termel és arra egy másik élesztőtörzs érzékeny, mesterségesen közel hozzák egymáshoz a szereplőket.

Amikor a létrehozott élesztő killer aktivitását vizsgáltam, vagy a felülúszót alkalmaztam (amiben a toxin nagy mennyiségben van jelen), vagy nagy mennyiségű sejtet vittem fel (kaccsal kihúzva) a metilénkékes táptalajra. A kevert kultúras fermentációk során a tápközegben kell hatnia a killer toxinnak, ami lényegesen kisebb koncentrációt jelent. Ez a körülmény közelebb áll ahhoz, ami egy erjesztés során fennáll.

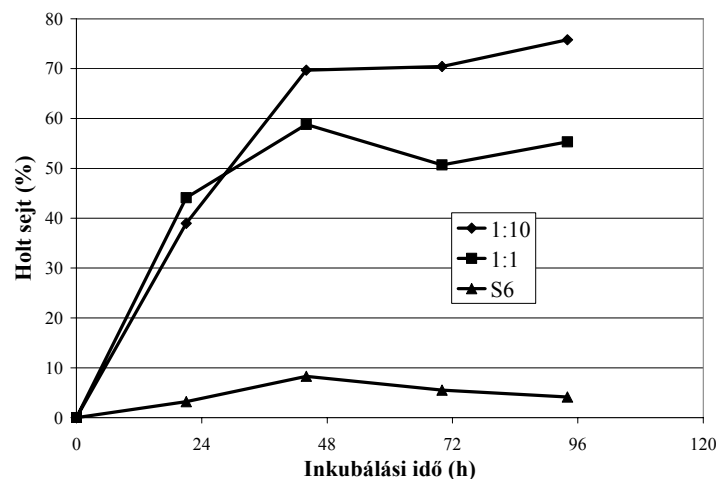
A WS K7/5 killer sörélesztőt és a *S. cerevisiae* S6 szuperszenzitív élesztőt három különböző keverési arányban vizsgáltam. A kezdő arányokat és sejtszámokat az 11. táblázatban foglaltam össze.

11.táblázat Kevert kultúrák kezdő sejt aránya és száma

WS K7/5 : <i>S. cerevisiae</i> S6	KEZDŐ SEJTSZÁM	
	WS K7/5	<i>S. cerevisiae</i> S6
1 : 100	$1,37 \times 10^6$ sejt/ml	$1,39 \times 10^8$ sejt/ml
1 : 10	$9,24 \times 10^6$ sejt/ml	$9,38 \times 10^7$ sejt/ml
1 : 1	$8,54 \times 10^7$ sejt/ml	$8,41 \times 10^7$ sejt/ml

Kontrollként az S6 törzset monokultúráként is leoltottam, és a kevert kultúrák mintákkal együtt inkubáltam 23°C-on, rázatva (80 rpm), 96 órán keresztül. Mintát 24 óránként vettem, Bürker-kamrás számlálással megállapítottam a sejtszámot, metilénkékes festéssel pedig a holtsejtek arányát. Mivel a két élesztő morfológiailag különböző volt, azt is meg tudtam állapítani, hogy a holtsejtek között mennyi a szuperszenzitív sejtek száma. Ellenőrző vizsgálatként a vett minta egy részét centrifugáltam és a felülúszó killer aktivitását agar diffúziós módszerrel megvizsgáltam.

Az 13. ábrán az 1:1 és 1:10 keverési aránynál, illetve az S6 monokultúrában számolt holt *S. cerevisiae* S6 sejtek százalékos értékét ábrázoltam (3 párhuzamos minta átlagértékei). Az 1:100 aránynál a metilénkékes festés nem mutatott sejtpusztulást. Az ellenőrző agar diffúziós vizsgálat is ezzel egybe csengő eredményt adott: az előbbi két keverési aránynál gátlási zóna alakult ki, de az 1:100 aránynál nem.



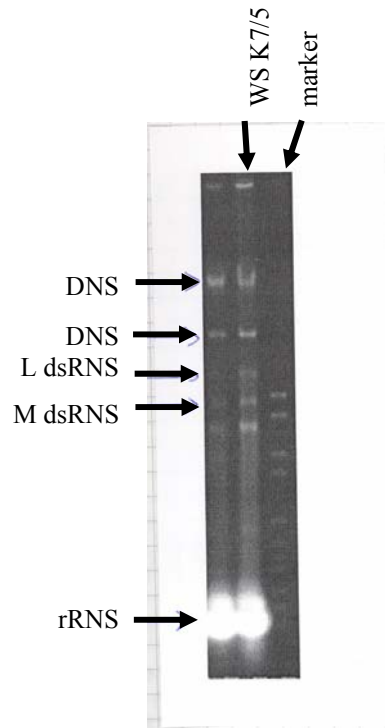
13.ábra. Holt sejtek aránya az inkubáció során

Természetesen ezek az arányok eltűzöttak, hiszen egy ipari fermentáció során nem fordulhat elő, hogy a vadélesztő koncentrációja százszorosa, tízszerese vagy akár egyenlő legyen a sörélesztő koncentrációjával. A kísérlet azt demonstrálja, hogy az élesztő által termelt toxin viszonylag kis mennyiségben is hatékony lehet.

5.1.3.3 A dsRNS jelenlétének kimutatása

A protoplaszt fúzió utáni, majd a fenn bemutatott vizsgálatok –, amelyeket egy évvel később végeztem – igazolták, hogy akkor az élesztő hordozta a killer toxin termeléséért felelős dsRNS-t. A killer élesztőknél azonban előfordul, hogy a sejtosztódások során a plazmid elvész a sejtéből. A protoplaszt fúzió termékeit a létrehozásuk óta számos alkalommal átoltottam, ezért szükségesnek láttam, hogy azt is ellenőrizsem, hogy megőrizték-e killer aktivitásukat.

A protoplaszt fúzió után 3 évvel, 2003-ban megismételtem a dsRNS plazmid izolálását abból a törzsből, amelyekkel a rögzített erjesztési kísérleteket és a fenn bemutatott vizsgálatokat végeztem (WS K7/5) (14. ábra), továbbá metilénkékes táptalajon ez után is rendszeresen teszteltem az élesztők killer aktivitását. Az alábbi képek 2005 júliusában készültek, és mutatják, hogy mindkét fúzió (*S. cerevisiae* WS 34/70 + *S. cerevisiae* K7 és *S. pastorianus* NCAIM 805 + *S. cerevisiae* K7) termékei megőrizték azt (15. ábra).



14.ábra. Az L és M dsRNS izolálása és elektroforetikus elválasztása. Ellenőrző vizsgálat



S. pastorianus NCAIM 805 + *S. cerevisiae* K7 fúziós termékei



S. cerevisiae WS 34/70 + *S. cerevisiae* K7 fúziós termékei

15.ábra. Protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörélesztő aktivitásának ellenőrzése (2005. július)

A WS K7/5 fúziós termékkel végzett vizsgálatok azt igazolták számomra, hogy egy protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörélesztő akkor is hatékonyan képes toxint termelni és érzékeny (vad)élesztőket elpusztítani az erjesztés során, ha relatíve kis mennyiségben van jelen a káros élesztőhöz viszonyítva. A vizsgálatok szerint a killer élesztő erre az optimális 23°C alatt is képes, noha csökkent aktivitással. Végezetül pedig a vizsgálatok azt mutatták, hogy a toxint kódoló plazmid tartósan megmaradt az élesztőtörzsben.

5.2 KEVERT KULTÚRÁS ERJESZTÉSEK SÖRÉLESZTŐVEL ÉS IDEGEN ÉLESZTŐKKEL

Az alkoholmentes vagy alkoholszegény söröket kétféle eljárással állíthatják elő. Az egyik módszer a kész sör alkohol-tartalmának eltávolítása/csökkentése bepárlás, reverz ozmózis stb. eljárások segítségével. Ehhez komoly beruházásra van szükség. A másik módszer olyan cefrézési és erjesztési eljárás alkalmazása, amely a folyamat végén kevés alkoholt eredményez.

Az alkoholmentes vagy alkoholszegény sörök egyik lehetséges előállítási módja, hogy olyan élesztőt használunk az erjesztéshez, aminek szénhidrát hasznosítása, így alkoholtermelő képessége eltér a sörélesztőjétől. Minthogy a sörlében a maltóz a legnagyobb koncentrációban előforduló cukor, a speciális élesztőnek maltóz negatívnak kell lennie. Maltóz negatív élesztőtörzsek ismertek a sör előállításával foglalkozó szakemberek előtt (KUNZE 1999). Az élesztőtörzsek ipari felhasználásával kapcsolatban azonban nem találtam adatokat a szakirodalomban.

Azok a speciális élesztők, amelyek nem erjesztik a maltózt, csökkentett alkoholtartalmú terméket eredményeznek ugyan, viszont a sörélesztőtől eltérő anyagcseréjük révén újszerű aromákkal is szolgálnak.

Munkám során azt kívántam megvizsgálni, hogy milyen hatással lenne a sörélesztő és a speciális élesztő kevert kultúrában való alkalmazása, ami alacsony alkoholtartalmú, ám a hagyományos alkoholmentes sörre emlékeztető terméket eredményezhet.

Dolgozatomnak a kevert kultúrákkal foglalkozó fejezeteiben az idegen élesztő kifejezést használom – a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő törzsön kívül - minden általam alkalmazott élesztőtörzsre. Szinonimaként egyes esetekben a „speciális élesztő” kifejezést is használom.

Az élesztők szelekcióját tehát annak figyelembe vételével végeztem, hogy a termék alkoholtartalma 2 V/V% alatt, aromája pedig a sörhöz hasonlatos legyen. A kevert kultúrák vizsgálatokkal az volt a célom, hogy kiválasszam azt az élesztőtörzset (vagy törzseket) és azt a keverési arányt, ami ezeknek a feltételeknek megfelel.

5.2.1 Élesztőtörzsek szelekciója

Hat élesztőtörzsen végeztem fermentációs tesztet, az eredményét az 12. táblázat foglalja össze.

12.táblázat Speciális élesztőtörzsekkel végzett fermentációs vizsgálat eredménye

	GLÜKÓZ	FRUKTÓZ	SZACHARÓZ	MALTÓZ	GALAKTÓZ	MELIBIÓZ	RAFFINÓZ
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	++	++	++	-	-	-	++
<i>Saccharomyces exiguus</i>	++	++	++	-	++	-	-
<i>Saccharomyces bayanus</i> DSM 70412	++	++	++	+	-	-	++
<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	++	++	++	-	++	-	-
<i>Torulaspóra delbrueckii</i> DSM 70504	++	++	++	++	-	-	++
<i>Torulaspóra delbrueckii</i> DSM 70607	++	++	++	-	-	-	++

++: gáz- és savtermelés; +: savtermelés; -: a szénhidrátot nem hasznosította

Négy törzs egyértelműen maltóz negatív volt, egy törzsnél pedig sav- és gáztermelést is tapasztaltam, tehát a maltózt erjesztette. A *Saccharomyces bayanus* törzs nem adott egyértelmű eredményt.

Elvégeztem egy más jellegű erjesztési próbát is. Mivel a kísérleteket sörlében terveztem elvégezni fontos lehet, hogy abban a közegben hogyan viselkednek az élesztők. A törzseket sörlébe oltottam be, majd 5 napig 25°C-on inkubáltam. A sörlé, majd az erjesztett minták szénhidrát tartalmát HPLC-vel meghatároztam.

13.táblázat Erjesztési próba sörlében

	FRUKTÓZ		GLÜKÓZ		SZACHARÓZ		MALTÓZ		MALTOTRIÓZ	
	g/100mg*	%**	g/100mg	%	g/100mg	%	g/100mg	%	g/100mg	%
Sörlé	0,5		1,3		0,2		5,4		1,2	
<i>S. exiguus</i>	0	100	0	100	0	100	4,9	10	1,1	13
<i>S. bayanus</i> DSM 70412	0,3	47	0,2	85	0	100	2,7	50	0,7	47
<i>S. delbrueckii</i>	0	100	0	100	0	100	0,9	83	0,4	67
<i>T. delbrueckii</i> DSM 70504	0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
<i>T. delbrueckii</i> DSM 70607	0	100	0,1	95	0	100	4,9	10	1,1	13

* Maradék szénhidrát mennyisége az erjesztés után

** Hasznosítás mértéke

A 13. táblázat mutatja, hogy az 5 napos erjesztést követően a sörlé erjeszhető szénhidrátjait hány százalékban hasznosították az egyes élesztők, illetve hogy mennyi volt a maradék szénhidrát az erjesztést követően. Mivel a *Saccharomyces bayanus* DSM 70412 törzs csak 50%-ban hasznosította a maltózt, ám a glükózt, maltotriózt és fruktózt is csak részben használta fel, ezért további alkalmazása mellett döntöttem. A *Saccharomyces delbrueckii* törzset pedig a fermentációs próbán mutatott teljesítménye (maltóz nem hasznosítása) miatt teszteltem tovább.

A két vizsgálat eredményei alapján az alábbi 5 törzssel folytattam munkámat:

- *Saccharomyces exiguus*
- *Saccharomyces delbrueckii*
- *Saccharomycodes ludwigii*
- *Saccharomyces bayanus* DSM 70412
- *Torulaspota delbrueckii* DSM 70607

5.2.2 Kevert kultúras erjesztések

A felsorolt 5 idegen élesztő törzs mellett sörélesztőként a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 törzset használtam. Ezt az élesztőt az iparban is széles körben alkalmazzák, mert kiváló erjesztési és aromatermelési tulajdonságokkal rendelkezik.

A Módszerek fejezetben megadott módon szaporítottam az élesztőket az erjesztéshez.

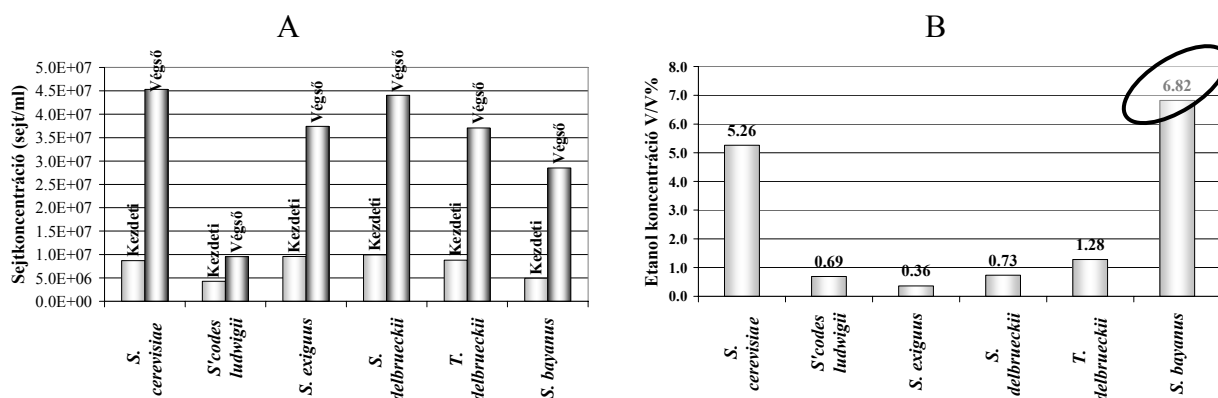
A fermentáció 300 ml steril sörleében történt, a lombikokat 8°C-on inkubáltam termosztátban, rázatás nélkül 7 napig.

Az erjesztés végén Bürker-kamrás számlálással meghatároztam a végső sejtkoncentrációt, illetve a sörélesztő és idegen élesztő sejtek arányát a mintában. A sejtek megkülönböztetését azok morfológiai – alak és méret – eltérése tette lehetővé.

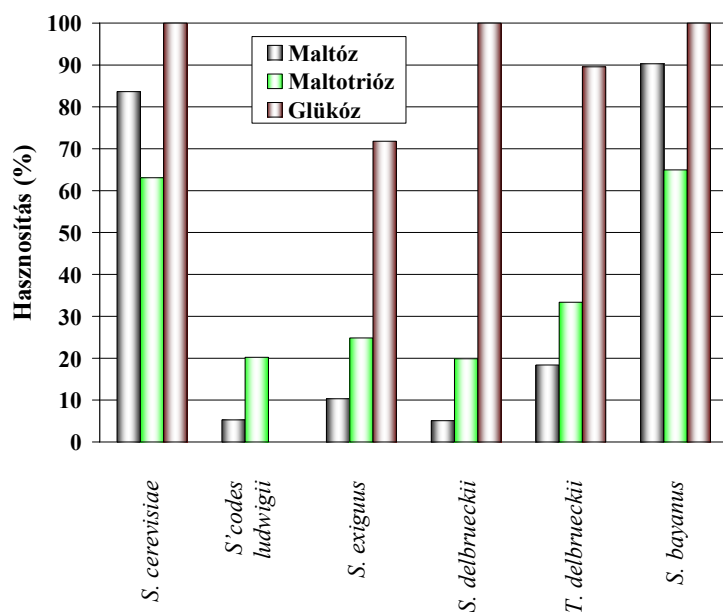
5.2.2.1 I. erjesztési kísérlet. Monokultúras erjesztés

A kísérletek első körében monokultúras erjesztést végeztem. Az eredmények alapján ez egy újabb szelekciós lépésnek bizonyult.

Az erjesztés elején és végén számolt sejtkoncentrációkat a 16/a ábra, az etanol koncentrációt a 16/b ábra, a szénhidrát hasznosítást a 17. ábra szemlélteti.



16/a.ábra. A monokultúras erjesztések sejtkoncentrációjának változása
 16/b.ábra. A monokultúras erjesztések során az élesztőtörzsek által termelt etanol koncentrációja



17.ábra. Sörélesztő és idegen élesztők szénhidrát hasznosítása monokultúras erjesztésekben

A sörlemben végzett monokultúras erjesztések során a *Saccharomyces ludwigii* élesztő szaporodott a leggyengébben, a rendelkezésére álló erjeszhető szénhidrátokból keveset hasznosított. Ennek következtében csekély mennyiségű alkoholt termelt. A *Saccharomyces exiguus*, a *Saccharomyces delbrueckii* és a *Torulaspóra delbrueckii* élesztők sejtkoncentrációja lényegesen nagyobb mértékben nőtt, ám ezek az élesztők is csak a glükózból fogyasztottak relatíve többet, a másik két szénhidrátból minimális mennyiséget erjesztettek. Alkohol termelésük még így is nagyon kevés volt. A jelenséget mind a négy élesztő esetében magyarázza, hogy maltóz negatív törzsekről van szó, és ennek megfelelően viselkedtek a sörlemben, melynek fő szénhidrátja a maltóz. A szénhidrát hasznosításra vonatkozó vizsgálatok eredményével ellentétben a *Saccharomyces bayanus* élesztő szinte teljes egészében felhasználta a maltózt. Ennek tükrében nem meglepő, hogy 6,28 V/V% alkoholt mutattam ki az erjesztést követő vizsgálatban. A *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 élesztő sörélesztőhöz méltóan a rendelkezésére álló erjeszhető szénhidrátokat nagy mértékben felhasználta. Az általa termelt alkohol mennyisége is átlagosnak mondható.

Az aroma anyagok koncentrációját az 14. táblázat ismerteti.

14.táblázat A monokultúras erjesztések során termelt aroma anyagok koncentrációja

	ACETALDEHID	DMS	ÉTIL-ACETÁT	PROPANOL	I-BUTANOL	I-AMILACETÁT	I-AMILALKOHOL	DIACETIL	2,3-PENTÁNDION
	mg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
<i>S. cerevisiae</i>	20,2	10	10,1	12,4	10,7	0,9	56,5	285	288
<i>S. codes ludwigii</i>	6,3	12	2,5	3,2	21,1	0,1	49,2	22	4
<i>S. exiguus</i>	42,8	10	0,7	5,1	6,5	0,04	13,5	22	11
<i>S. delbrueckii</i>	9,4	9	1,7	6,2	5,2	0,02	28,7	8	12
<i>T. delbrueckii</i>	14,0	17	5,4	5,5	4,1	0,02	15,5	454	38
<i>S. bayanus</i>	39,0	8	5,9	14,4	11,4	0,3	40,7	821	392
<i>S. cerevisiae</i> (ipari körülmények között)*	13,2	18	8,6	20,3	20,6	0,9	78,2	255	392

* MISINKSZKI 2000

A táblázat utolsó sorában látható értékek a hagyományos élesztővel erjesztett fickósörök (az erjedés 72. órájában) aroma anyag koncentrációit mutatják (MISINSZKI 2000). Figyelemre méltó a *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces exiguus* és *Saccharomyces delbrueckii* élesztők mintáiból mért alacsony diacetil tartalom (mely vegyület a sör íze szempontjából igen hátrányos), illetve néhány más vegyület mennyisége is, amelyek a sör ízéhez kedvezően járulnak hozzá, és az idegen élesztők is elfogadható mennyiségben termelték azokat (ezeket kiemeltem a 13. táblázatban). Jóllehet, a *Saccharomyces bayanus* néhány aromaanyag tekintetében kedvező képet mutat, de a diacetilből rendkívül nagy mennyiséget mutatott ki a gázkromatográfiás vizsgálat. Emiatt és a nagy etanol termelése miatt a további kísérletek során a *Saccharomyces bayanus*-t nem használtam.

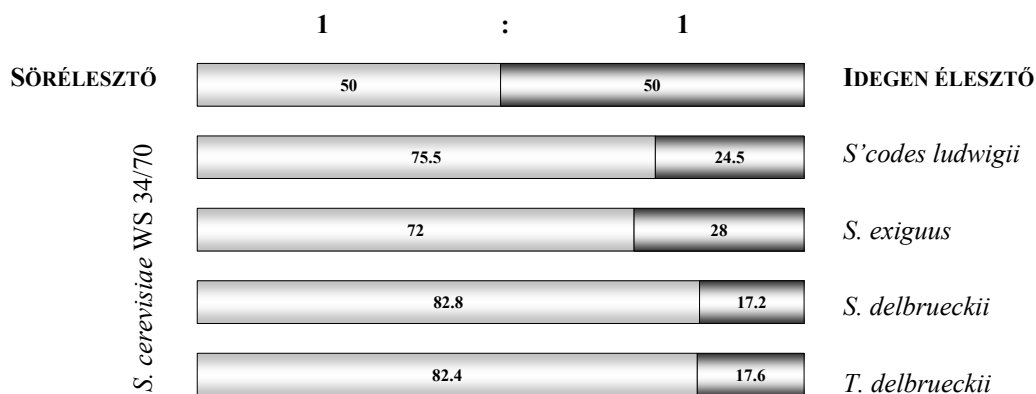
5.2.2.2 II.a erjesztési kísérlet. Kevert kultúras főerjesztés

A kísérletek második körében négy idegen élesztővel és a sörélesztővel végeztem erjesztést négy keverési arány beállításával. A keverési arányokat annak tudatában választottam, hogy a tápközeg a *S. cerevisiae* sörélesztőnek fog kedvezni. A sörlé a sörélesztő számára ideális tápközeg, a többi élesztőnek – már csak szénhidrát összetétele miatt – nem az. Az első keverési aránynál egyenlő sejtszámmal indultak az élesztők, majd az idegen élesztőket különböző mértékű előnnyel indítottam.

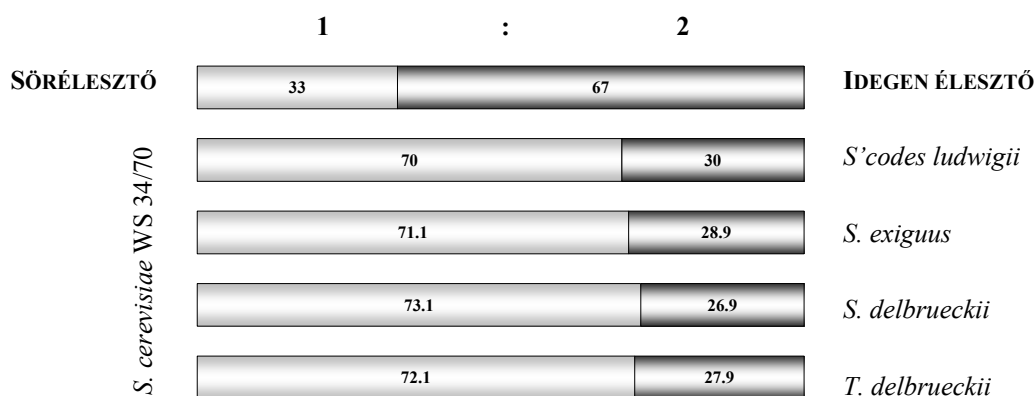
SÖRÉLESZTŐ	:	IDEGEN ÉLESZTŐ
1	:	1
1	:	2
1	:	5
1	:	10

A kezdő sejtszámokat úgy állítottam be, hogy az idegen élesztők 1×10^7 sejt/ml koncentrációban, a *Saccharomyces cerevisiae* sörélesztő pedig az arányoknak megfelelően 2-10-szer kisebb koncentrációban volt jelen az erjesztés indításakor. A sejtek szaporítása is sörlében történt, amiben a maltózt nem használó élesztők kisebb ütemben szaporodnak. Azért kellett a beoltásnak ezt a módját alkalmazni, mert a rendelkezésre álló sejt mennyiségből csak ilyen módon lehetett elérni a kívánt arányokat.

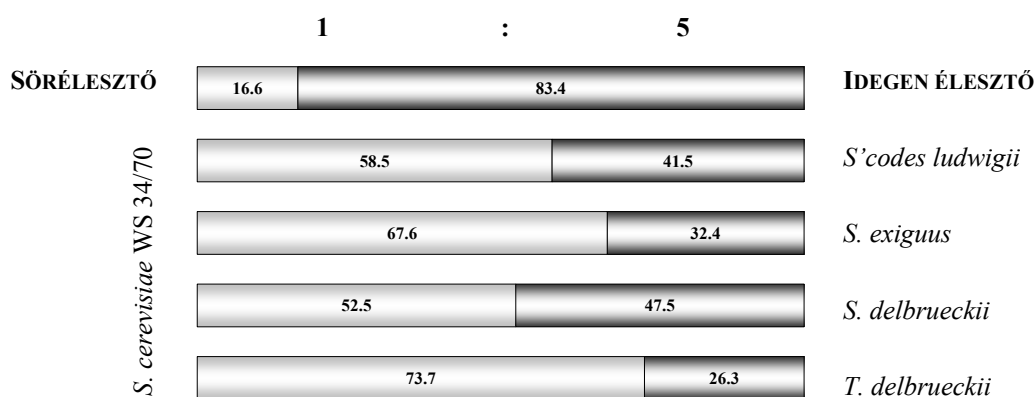
A következő négy ábrán a kevert kultúras erjesztések végén megállapított sörélesztő-idegen élesztő arányokat ábrázoltam (18-21. ábra).



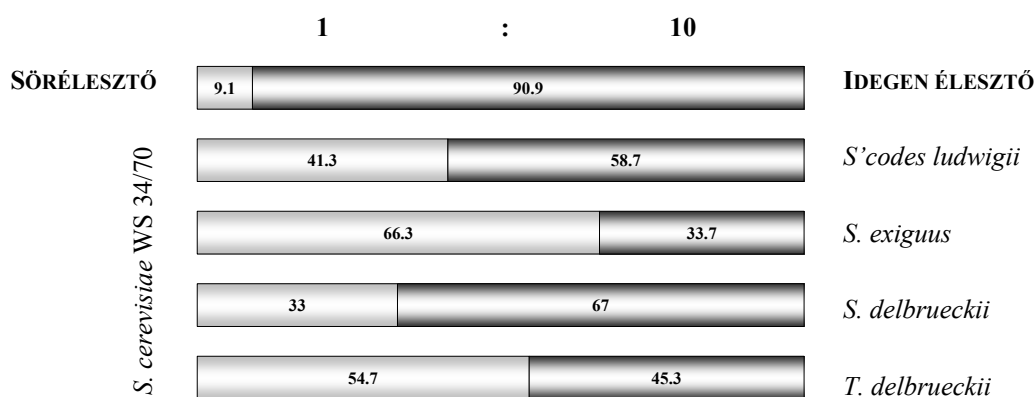
18.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:1 sörélesztő-idegen élesztő kezdeti sejtarányánál



19.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:2 sörélesztő-idegen élesztő kezdeti sejtarányánál

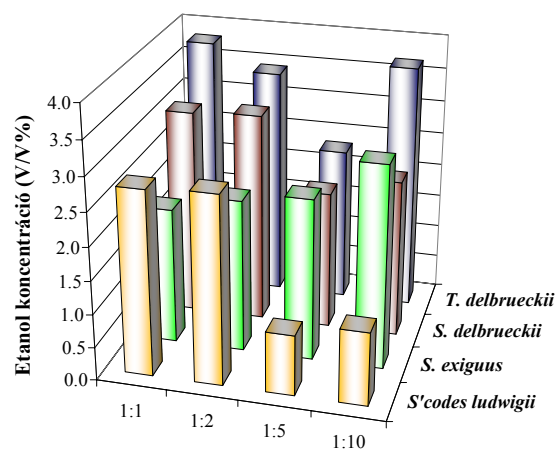


20.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:5 sörélesztő-idegen élesztő kezdeti sejtarányánál



21.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:10 sörélesztő-idegen élesztő kezdeti sejtarányánál

A feltételezés, miszerint a táptalaj összetétel a sörélesztőnek fog kedvezni, a sejtkoncentráció arányokon megmutatkozott. Általánosságban elmondható, hogy a kezdeti sejtkoncentrációk fele volt mérhető az idegen élesztőknél az erjesztés végén az 1:1 és 1:2 arányú beoltásnál. Az 1:5 arány esetében a *S. delbrueckii* és a *S'codes ludwigii* nagyobb arányban volt jelen az erjesztés végén, mint a másik két törzs. Ez a tendencia figyelhető meg az 1:10 aránynál is. Tízszeres mennyiségben kellett beoltani az idegen élesztőket ahhoz, hogy az egy hetes erjesztés végére is megmaradjon a – kezdetinél lényegesen kisebb – túlsúlyuk. Ám ez is csak két törzs, a *Saccharomyces delbrueckii* és a *Saccharomyces delbrueckii* esetében alakult így. (A Melléklet I. táblázatában az erjesztések kezdeti és végső sejtkoncentrációit, illetve sörélesztő:idegen élesztő százalékos sejtarányait összegeztem.)



22.ábra. Különböző arányú kevert kultúrákban mért etanol koncentrációk az erjesztést követően

Megvizsgálva a végső sejtarányok és az alkoholtartalom összefüggését az egyes keverékeknél az alábbiakat találtam (22. ábra).

Saccharomyces ludwigii: Mind a négy keverési aránynál relatíve alacsony alkoholkoncentrációkat mértem. Az 1:1 és 1:2 arányoknál a többi élesztőt tartalmazó tenyészetekhez képest is alacsony az etanol mennyisége, noha a keverékben lévő élesztők aránya hasonló. Magyarázat lehet erre a kisebb végső sejtkoncentráció.

Saccharomyces exiguus: Az élesztő számára a sörlé határozottan kedvezőtlen tápközegnek tűnik. Bármilyen volt a kezdő sörélesztő:*S. exiguus* arány, az erjesztés végén a sörélesztő kétszer akkora mennyiségben volt jelen. Ennek ellenére az etanol koncentráció viszonylag alacsony maradt, amire az összes végső sejtszám alacsony értéke lehet a magyarázat. (Melléklet I. táblázat)

Saccharomyces delbrueckii: Az 1:5 és 1:10 kiindulási keverési aránnyal indított erjesztések végén az *S. delbrueckii* nagyobb arányban volt jelen, mint a többi idegen élesztő. A mért alkoholkoncentráció is viszonylag alacsony maradt, egyedül az *S'codes ludwigii* esetében volt kevesebb etanol az erjesztés után az 1:10-es aránynál.

Torulaspora delbrueckii: Az élesztő számára szintén határozottan kedvezőtlen erjesztési közegnek bizonyult a sörlé. A sörélesztő aránya magas volt mind a négy erjesztés végén, ami magyarázat a viszonylag magas etanol koncentrációkra.

15.táblázat Aroma anyagok koncentrációja a főerjesztés végén 4 különböző sörélesztő-idegen élesztő kezdeti sejtarányánál

	ACETALDEHID	DMS	ÉTIL- ACETÁT	PROPANOL	I-BUTANOL	I-AMILACETÁT	I-AMILALKOHOL	DIACETIL	2,3- PENTÁNDION
	mg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:1									
<i>S'codes ludwigii</i>	27,0	13	7,1	7,6	11,0	0,7	44,8	175	117
<i>S. exiguus</i>	30,3	10	7,4	10,1	7,8	0,6	43,8	364	300
<i>S. delbrueckii</i>	30,5	9	8,2	11,1	8,5	0,7	48,6	446	378
<i>T. delbrueckii</i>	29,7	12	8,1	10,4	8,2	0,7	45,2	566	373
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:2									
<i>S'codes ludwigii</i>	23,9	8	6,0	6,6	11,5	0,7	42,8	130	79
<i>S. exiguus</i>	27,9	5	5,9	8,5	7,4	0,6	42,8	262	203
<i>S. delbrueckii</i>	25,8	7	6,8	9,3	7,6	0,6	46,1	364	224
<i>T. delbrueckii</i>	27,3	9	7,2	9,0	7,2	0,6	43,5	415	188
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:5									
<i>S'codes ludwigii</i>	10,9	10	5,0	6,2	17,3	0,1	34,7	69	22
<i>S. exiguus</i>	26,6	7	5,8	7,6	7,1	0,8	39,8	158	117
<i>S. delbrueckii</i>	23,3	7	6,2	9,3	8,3	0,8	39,8	114	74
<i>T. delbrueckii</i>	32,0	10	7,4	8,4	6,7	0,7	37,5	527	116
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:10									
<i>S'codes ludwigii</i>	12,2	11	5,9	6,1	23,9	0,3	46,3	58	17
<i>S. exiguus</i>	22,7	6	5,9	9,7	8,8	0,9	45,2	197	169
<i>S. delbrueckii</i>	22,1	10	6,8	11,9	9,4	1,0	45,5	112	74
<i>T. delbrueckii</i>	28,2	13	11,2	11,3	8,7	1,1	48,7	590	191
<i>S. cerevisiae</i> (ipari körülmények között)*	13,2	18	8,6	20,3	20,6	0,9	78,2	255	392

*MISINSZKI 2000

Az aroma anyagok koncentrációjában – különösen az 1:1 és 1:2 arányánál – a *Saccharomyces cerevisiae* sörélesztő tevékenysége fedezhető fel (15. táblázat). Az 1:5 és 1:10 arányoknál megjelenik a *Saccharomyces ludwigii* hatása: ez az élesztő már a monokultúras erjesztésben is jelentős mennyiségben termelt izo-butanolt és izo-amilalkoholt. Ennél a két kezdeti keverési arányánál az erjesztés végén relatíve magas volt az idegen élesztő sejtek aránya, így a két vegyület is nagyobb koncentrációban volt jelen.

A diacetil mennyiségének változása is érdekes. A monokultúras erjesztések során a – *T. delbrueckii* kivételével – idegen élesztők kb. tizedannyi diacetilt termeltek, mint a sörélesztő. Amelyik kevert kultúras erjesztés végén (főleg az 1:5 és 1:10 arányánál) az idegen élesztők kicsit nagyobb mennyiségben voltak jelen, ott a diacetil koncentrációja lényegesen alacsonyabb volt. A *S'codes ludwigii* esetében ez annyira igaz, hogy koncentrációja további utóerjesztés nélkül is olyan kevés volt, mint egy kész sörben. A *T. delbrueckii* élesztő önmaga is jelentős mennyiségben termel diacetilt, ahogy ez már a monokultúras erjesztésnél is kiderült.

5.2.2.3 II.b erjesztési kísérlet. Kevert kultúras utóerjesztés

A kísérleti munkám folytatásában azt vizsgáltam, hogy az utóerjesztés milyen hatással van a sörélesztő és idegen élesztő keverékével erjesztett termék minőségére.

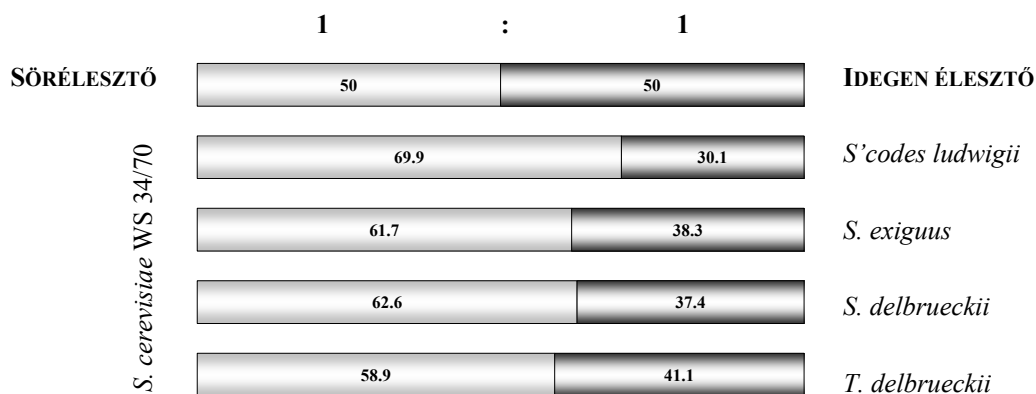
A sörgyártás során a főerjesztést követően az élesztőket eltávolítják a fickósörből, majd a hőmérséklet csökkentése után érlelik a sört. Ez utóbbi folyamat során bizonyos vegyületek koncentrációja csökken, pl. az acetaldehidé és a diacetilé. A terméket akkor tekintik kereskedelmi forgalombahozhatóknak, amikor ez utóbbi koncentrációja 100 µg/l alá csökken.

Az erjesztéseket ugyanazzal a négy idegen élesztővel (*Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Torulaspora delbrueckii*) és sörélesztővel (*Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70), azonos kezdő sejtarányokkal végeztem. A főerjesztés 7 napig tartott 8°C-on, majd a sejtek elvétele után az utóerjesztést 14 napig végeztem 0°C-on. Természetesen az élesztők elvétele után is maradtak sejtek a mintákban – ahogy a nagyüzemi sörgyártás során is – amiknek fontos szerepe van a vegyületek egy részének redukációjában (diacetil!) és mások további szintézisében.

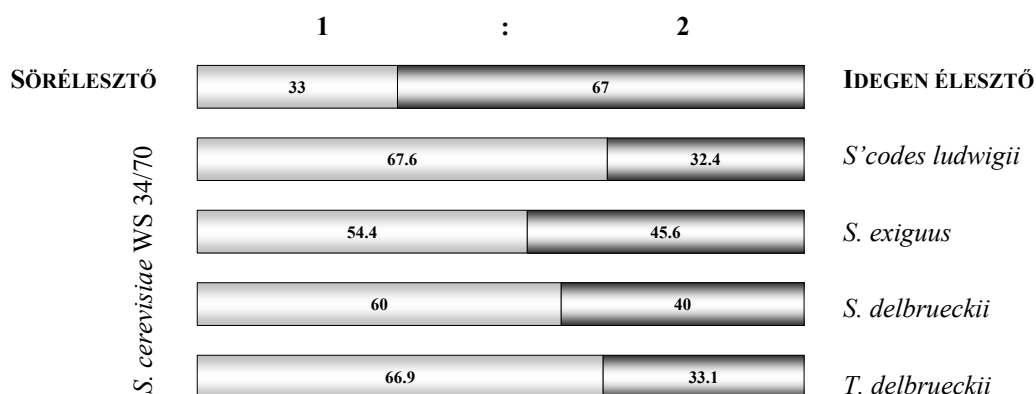
A mintákat söranalizátorral és gázkromatográfiával vizsgáltam. Az adatok elemzésénél ezúttal az alábbi kérdésekre fókuszáltam:

- Hogyan alakul az etanol koncentrációja? A főerjesztés végén még jelen van az erjeszthető szénhidrátok egy része, amit a mintában maradó élesztők tovább erjesztenek.
- Hogyan változik az aroma anyagok koncentrációja? Elsősorban a diacetil koncentrációja fontos a már említett okok miatt. A *S. codes ludwigii* kivételével a kevert kultúrák mintáiban meglehetősen magas volt a diacetil koncentrációja az egy hetes 8°C-on végzett főerjesztés során. Természetesen a további aroma anyagok, kozmaolajok és észterek mennyisége is érdekelt.

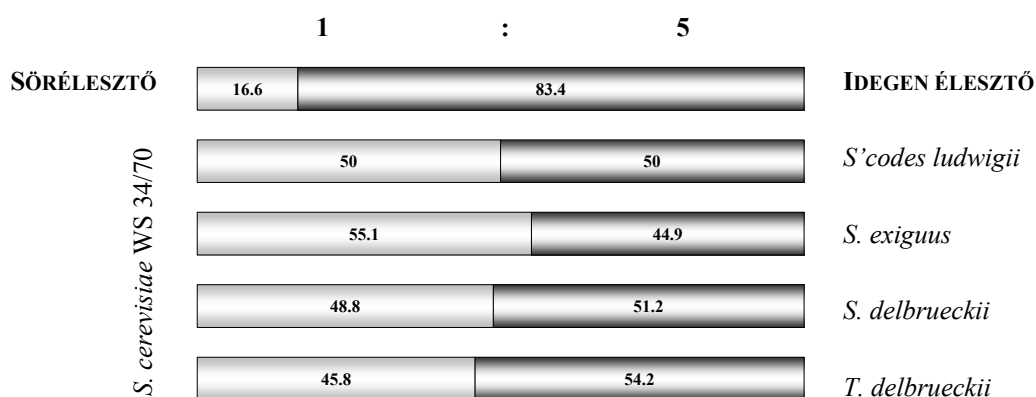
A főerjesztés végén megállapított sörélesztő-idegen élesztő sejtek arányának (23-26. ábra) és az ugyanekkor mért etanol koncentrációknak (16. táblázat) az összefüggését elemezve a következőket tapasztaltam. A *Saccharomyces ludwigii* és a *Saccharomyces exiguus* élesztőkkel való főerjesztés végén nagyon hasonló sörélesztő-idegen élesztő arányokat kaptam, mint az első erjesztésnél. Ennek megfelelően a minták etanol tartalma is nagyon hasonló volt. A *Saccharomyces delbrueckii* és *Torulaspora delbrueckii* élesztőknél a főerjesztés végén nagyobb arányban voltak jelen a idegen élesztők, ami alacsonyabb alkoholtartalommal járt. (A Melléklet II. táblázatában az erjesztések kezdeti és végső sejtkoncentrációi, illetve sörélesztő-idegen élesztő százalékos sejtarányai összegezve is megtalálhatók.)



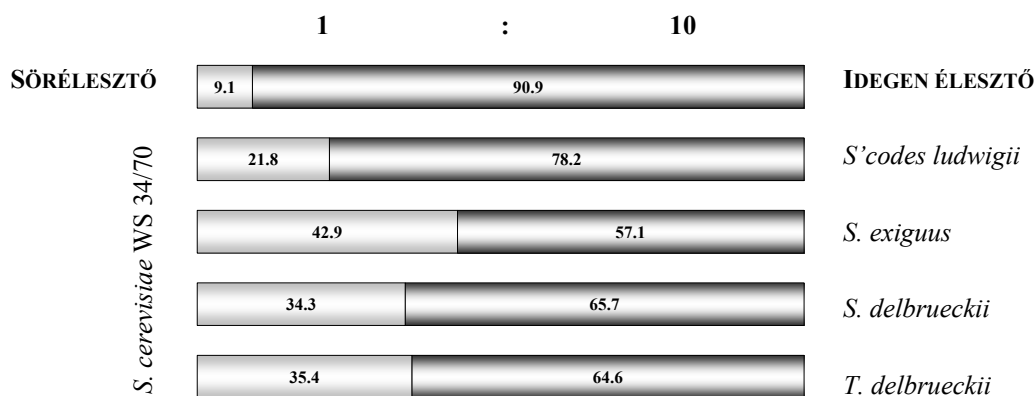
23.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:1 sörélesztő-idegen élesztő kezdeti sejtarányánál



24.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:2 sörélesztő- idegen élesztő kezdeti sejtarányánál



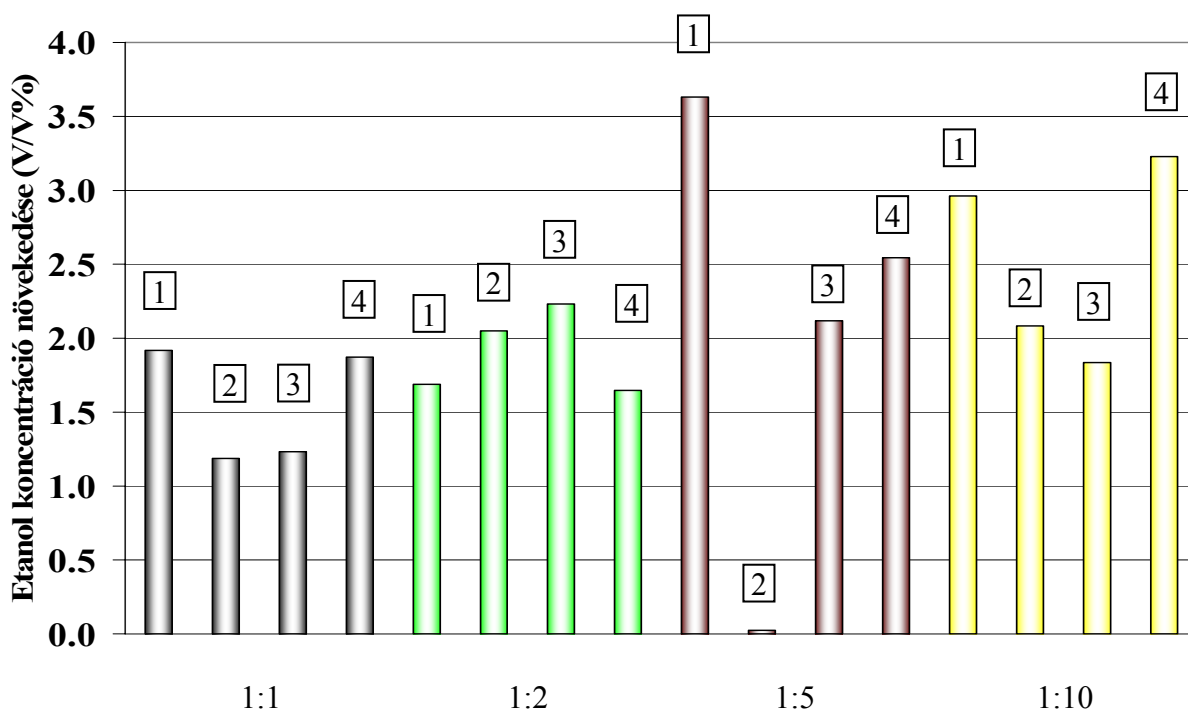
25.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:5 sörélesztő- idegen élesztő kezdeti sejtarányánál



26.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:10 sörélesztő- idegen élesztő kezdeti sejtarányánál

16.táblázat A főerjesztés és utóerjesztés végén mért etanol koncentrációk

		ETANOL KONCENTRÁCIÓ (V/V%)			VÉGERJEDÉS-FOK (%)
		FŐERJESZTÉS VÉGÉN	UTÓERJESZTÉS VÉGÉN	NÖVEKEDÉS MÉRTÉKE	
1:1	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. exiguus</i>	2,53	4,85	1,9	69,84
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S'codes ludwigii</i>	2,89	3,43	1,2	51,37
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. delbrueckii</i>	2,84	3,50	1,2	52,56
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>T. delbrueckii</i>	2,10	3,93	1,9	58,48
1:2	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. exiguus</i>	2,98	5,03	1,7	75,76
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S'codes ludwigii</i>	1,81	3,71	2,0	54,66
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. delbrueckii</i>	2,20	4,91	2,2	71,74
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>T. delbrueckii</i>	1,67	2,75	1,6	40,87
1:5	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. exiguus</i>	2,12	7,70	3,6	73,58
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S'codes ludwigii</i>	1,28	NA	NA	NA
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. delbrueckii</i>	1,63	3,45	2,1	50,45
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>T. delbrueckii</i>	1,34	3,41	2,5	50,04
1:10	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. exiguus</i>	1,59	4,71	3,0	70,07
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S'codes ludwigii</i>	0,85	1,77	2,1	26,89
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. delbrueckii</i>	2,12	3,89	1,8	56,88
	<i>S. cerevisiae</i> - <i>T. delbrueckii</i>	0,83	2,68	3,2	39,71



27.ábra. Az etanol koncentrációjának növekedése az utóerjesztés során

(1: *S. cerevisiae* – *S. exiguus*; 2: *S. cerevisiae* – *S'codes ludwigii*; 3: *S. cerevisiae* – *S. delbrueckii*; 4: *S. cerevisiae* – *T. delbrueckii*)

A minták végerjedés-foka áttételesen, de utal a maradék cukrok mennyiségére (16. táblázat). Egy normál sör esetében – amikor az élesztő az összes erjeszhető szénhidrátot felhasználta – a végerjedés-fok 82-83%. A táblázat adataiból kitűnik, hogy néhány esetben az erjeszhető szénhidrátok (glükóz, maltóz, maltotrióz, fruktóz, szacharóz) nagy részét felhasználták az élesztők, ami természetesen az etanol koncentrációkban is megmutatkozik. Az a jelenség, hogy az alkoholtartalom az utóerjesztés alatt közel ugyanannyival növekszik, mint a főerjedés során, azonban szokatlanak mondható, a hagyományos sörgyártásra nem jellemző. Az 27. ábrán

grafikusan is bemutatom az etanol mennyiségének növekedését az utóerjesztés alatt. Arra nincs információ, hogy a sörélesztő, illetve idegen élesztő sejtekből mennyi maradt a fickósörben az utóerjesztés elvégzésére. Az ábrán azonban felfedezhető egy olyan tendencia, hogy annál nagyobb mértékben növekszik az alkohol koncentrációja az utóerjesztés ideje alatt, minél nagyobb volt az idegen élesztő kezdő sejtszáma.

Ennek a vizsgálatnak érdekes tanulsága, hogy egy kevert kultúras erjesztésnél az utóerjesztés hatását is figyelembe kell venni.

A következő táblázatokban a főerjesztés és az utóerjesztés végén mért aroma anyag koncentrációkat, illetve az utóerjesztés alatti változást mutatom be (17., 18. táblázat).

17.táblázat Aroma anyagok koncentrációja a főerjesztés után

	ACETALDEHID	DMS	ETIL- ACETÁT	PROPANOL	I-BUTANOL	I-AMILACETÁT	I-AMILALKOHOL	DIACETIL	2,3-PENTÁNDION
	mg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:1									
<i>S'codes ludwigii</i>	21,5	10	8,6	10,2	14,3	0,4	44,4	231	151
<i>S. exiguus</i>	30,3	8	5,4	10,4	7,5	0,34	36,7	361	245
<i>S. delbrueckii</i>	32,6	13	4,6	9,5	7,4	0,3	35,4	378	225
<i>T. delbrueckii</i>	30,1	13	5,7	10,1	8,5	0,3	36,4	448	205
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:2									
<i>S'codes ludwigii</i>	18,9	10	6,7	6,7	14,8	0,3	39,5	161	70
<i>S. exiguus</i>	27,7	3	5,3	8,3	6,7	0,4	37,1	300	225
<i>S. delbrueckii</i>	30,7	9	4,7	8,0	6,9	0,4	34,3	340	207
<i>T. delbrueckii</i>	30,7	7	5,0	7,9	6,7	0,2	31,6	473	140
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:5									
<i>S'codes ludwigii</i>	19,1	8	5,3	5,6	16,2	0,3	38,5	72	21
<i>S. exiguus</i>	31,2	6	3,3	6,3	5,5	0,4	32,0	221	131
<i>S. delbrueckii</i>	30,5	1	3,3	5,6	5,9	0,4	28,4	124	64
<i>T. delbrueckii</i>	32,5	15	4,4	5,6	5,4	0,3	28,6	326	58
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:10									
<i>S'codes ludwigii</i>	14,5	8	4,6	4,2	18,2	0,2	39,3	45	12
<i>S. exiguus</i>	23,3	9	2,6	5,0	5,3	0,3	29,4	130	63
<i>S. delbrueckii</i>	28,7	10	3,5	6,2	6,1	0,5	30,3	94	45
<i>T. delbrueckii</i>	26,2	19	5,2	6,3	5,1	0,3	25,3	203	29
<i>S. cerevisiae</i> (ipari körülmények között)*	13,2	18	8,6	20,3	20,6	0,9	78,2	255	392

*MISINSZKI 2000

18.táblázat Aroma anyagok koncentrációja az utóerjesztés után

	ACETALDEHID	DMS	ÉTIL- ACETÁT	PROPANOL	I-BUTANOL	I-AMILACETÁT	I-AMILALKOHOL	DIACETIL	2,3-PENTÁNDION
	mg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:1									
<i>S'codes ludwigii</i>	15,2	2	7,9	11,4	14,3	0,4	44,3	104	68
<i>S. exiguus</i>	22,4	3	7,1	14,1	8,7	0,4	42,5	132	91
<i>S. delbrueckii</i>	21,0	3	5,2	11,4	7,7	0,3	36,8	164	100
<i>T. delbrueckii</i>	18,6	3	7,4	12,7	9,2	0,4	41,3	154	75
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:2									
<i>S'codes ludwigii</i>	12,2	1	11,4	9,8	14,8	0,6	43,7	78	46
<i>S. exiguus</i>	19,2	3	7,7	12,9	8,3	0,5	44,2	118	96
<i>S. delbrueckii</i>	14,8	4	8,8	12,5	8,5	0,6	43,5	135	99
<i>T. delbrueckii</i>	18,1	2	6,1	9,3	7,2	0,3	35,5	207	64
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:5									
<i>S'codes ludwigii</i>	9,2	3	5,5	6,4	15,8	0,3	40,3	56	21
<i>S. exiguus</i>	17,3	2	4,8	10,2	7,0	0,5	41,1	172	127
<i>S. delbrueckii</i>	16,5	2	5,8	9,0	7,2	0,5	38,5	137	86
<i>T. delbrueckii</i>	18,3	5	7,9	9,1	7,0	0,6	39,7	252	64
SACCHAROMYCES CEREVISIAE : IDEGEN ÉLESZTŐ = 1:10									
<i>S'codes ludwigii</i>	10,5	5	5,1	6,7	17,8	0,4	42,2	44	16
<i>S. exiguus</i>	15,1	4	6,9	11,1	8,2	0,6	45,8	132	101
<i>S. delbrueckii</i>	15,7	3	6,6	9,6	7,4	0,6	40,6	94	63
<i>T. delbrueckii</i>	15,7	4	7,5	8,8	6,7	0,6	36,4	330	63
Irodalmi adat*	2-10	<100	10-40	7-16	5-20	0,1-7,0	30-70	<100	<50

* KRÜGER&ANGER 1990

Az aromák vizsgálatánál nagyon hasonló eredményt kaptam, mint az első kevert kultúras erjesztéskor: a kevert kultúras minták több esetben elérték azt a koncentrációt, amit normál sörré ad meg az irodalom. Az itt kapott értékek azonban kicsit alacsonyabbak, ami a valószínűleg a nagyobb idegen élesztő arányoknak tudható be. Az utóerjesztés hatékonyságát mutatja, hogy pl. az észterek koncentrációjában – a kozmaolajokhoz hasonlóan – növekedés tapasztalható.

Az acetaldehid koncentrációja jelentősen csökkent. A főerjesztés után azonban az értékek meglehetősen magasak voltak, így az utóerjesztés végén is túllépték kis mértékben a határértéket.

A diacetil koncentrációja ez esetben is csak a *Saccharomyces ludwigii* törzsszel végzett erjesztések végén került a kívánatos érték alá. A *Torulaspora delbrueckii* élesztő ez alkalommal is jelentős mennyiségben termelte ezt a kellemetlen ízhibát okozó vegyületet, és bár az utóerjesztés alatt csökkentek az értékek, a 100 µg/l szint alá nem került.

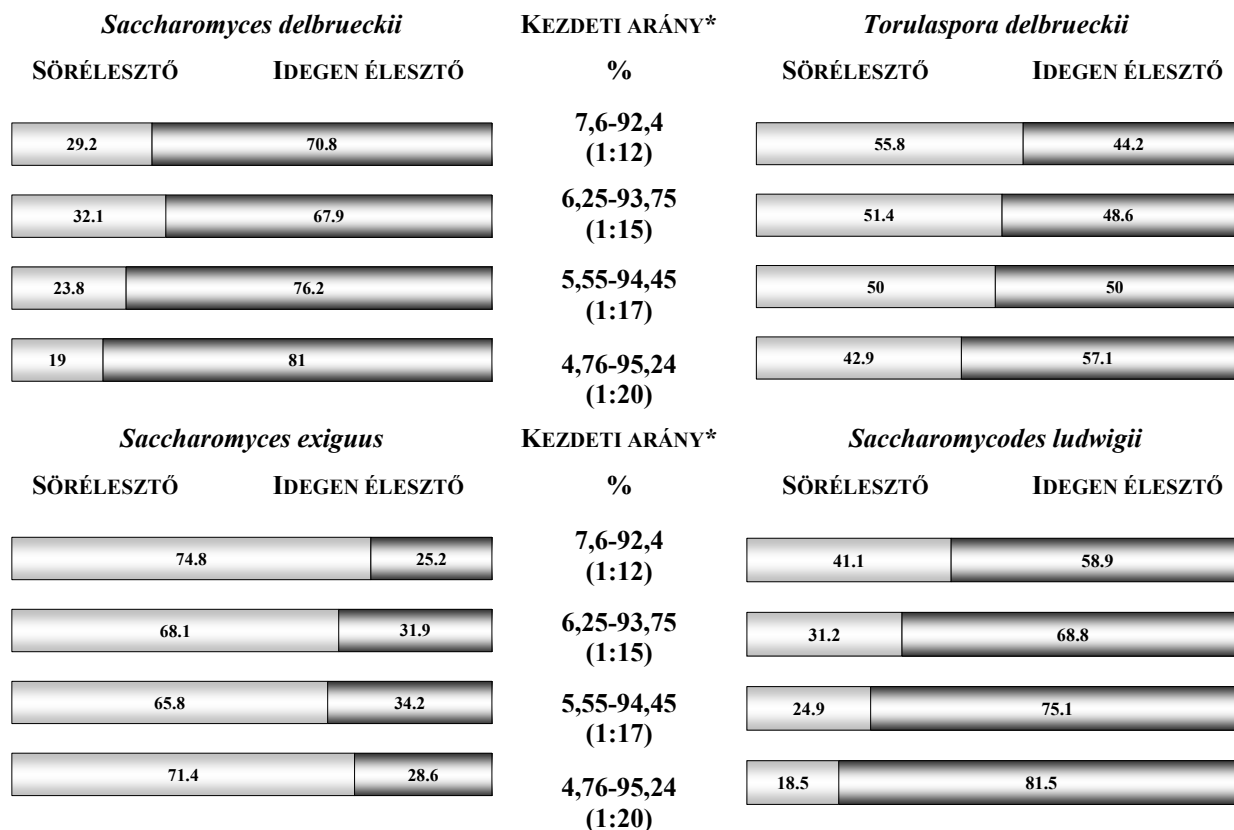
5.2.2.4 III. erjesztési kísérlet. Kevert kultúras erjesztés megnövelt idegen élesztő aránnyal

Az alkoholkoncentrációkra kapott értékek további vizsgálata érdekében az idegen élesztők arányát növelve újabb erjesztéseket végeztem.

SÖRÉLESZTŐ	:	IDEGEN ÉLESZTŐ
1	:	12
1	:	15
1	:	17
1	:	20

Az erjesztés kezdetén újra 1×10^7 sejt/ml koncentrációban oltottam be a *Saccharomyces cerevisiae* sörélesztőt és arányosan nagyobb koncentrációban az idegen élesztőket.

Az 28. ábrán ezúttal az egyes idegen élesztőkre lebontva mutatom be a négy különböző kezdeti arány után kialakult sörélesztő-idegen élesztő százalékos arányt. (A Melléklet III. táblázatában az erjesztések kezdeti és végső sejt koncentrációi, illetve sörélesztő:idegen élesztő százalékos sejtarányai összegezve is megtalálhatók.)



*Sörélesztő – idegen élesztő arány

28.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén különböző sörélesztő:idegen élesztő kezdeti sejtarányánál

Az 1:1-től 1:10-ig terjedő kezdő sejtarányoknál is voltak előjelei annak, hogy az idegen élesztők közül melyiket képes a sörélesztő jelentősebb mértékben túlnőni és melyiket nem.

A kérdés jelentősége abban rejlik, hogy ha kevert kultúras erjesztésben alkalmazzuk az élesztőket, és 2 V/V%-nál alacsonyabb alkoholtartalmat kívánunk elérni, akkor olyan idegen élesztőre van szükségünk, amit – a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő számára kedvezőbb tápközeg ellenére – nem fog túlnőni a sörélesztő. Ez automatikusan növekvő etanol tartalommal járna.

A fenti ábrákon jól látszik, hogy a *Saccharomyces exiguus* és *Torulaspóra delbrueckii* élesztőtörzsek „nem tudtak ellenállni” a sörélesztőnek. Sejt koncentrációjuk kezdeti előnye ellenére a sörélesztő jobban szaporodott a 7 napos erjesztés során. Ezzel ellentétben a *Saccharomyces delbrueckii* és *Saccharomycodes ludwigii* törzsek túlsúlya megmaradt.

19.táblázat A főerjesztés és utóerjesztés végén mért etanol koncentrációk

		ETANOL KONCENTRÁCIÓ V/V%		
		FŐERJESZTÉS VÉGÉN	ÚTÓERJESZTÉS VÉGÉN	NÖVEKEDÉS MÉRTÉKE
<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. exiguus</i>	1:12	1,41	3,32	2,4
	1:15	1,31	3,77	2,9
	1:17	1,72	3,69	2,1
	1:20	1,59	2,46	1,5
<i>S. cerevisiae</i> - <i>T. delbrueckii</i>	1:12	1,69	4,40	2,6
	1:15	1,86	4,52	2,4
	1:17	2,03	2,72	1,3
	1:20	2,16	3,09	1,4
<i>S. cerevisiae</i> - <i>S. delbrueckii</i>	1:12	4,55	4,96	1,1
	1:15	2,18	4,37	2,0
	1:17	4,29	6,26	1,5
	1:20	3,34	5,57	1,7
<i>S. cerevisiae</i> - <i>S'codes ludwigii</i>	1:12	1,20	1,89	1,6
	1:15	1,18	1,68	1,8
	1:17	1,20	2,11	1,4
	1:20	1,21	1,60	1,3

A főerjedés, majd utóerjesztés végén mért etanol koncentrációkat az 19. táblázat foglalja össze. Az utóerjesztés jelentőségét itt is látni. Az alkohol koncentrációja a *S. exiguus* és *T. delbrueckii* élesztőket tartalmazó erjesztések alkalmával a kezdeti alacsony értékről viszonylag sokat emelkedett. Érdekesebb jelenséggel állunk szemben azoknál az erjesztéseknél, ahol *S. delbrueckii* volt az idegen élesztő. Annak ellenére, hogy az erjesztés végén ez az élesztő volt jelen nagyobb arányban, az etanol koncentrációja már a főerjesztés végén magasabb volt, mint a többi mintában.

A *Saccharomyces ludwigii* volt az egyetlen idegen élesztő, amelynek a mintájában az utóerjesztés után is a kívánt alacsony értéken maradt az etanol koncentrációja. A jelenség oka minden bizonyára az, hogy a sörélesztő koncentrációja mind a négy kezdeti sejt aránynál alacsony maradt a főerjesztés végéig. A 20. és 21. táblázat az aroma anyagok koncentrációját összegzi a főerjesztés és utóerjesztés után.

20.táblázat Aroma anyagok koncentrációja a főerjesztés után

	ACETALDEHID	DMS	ETIL-ACETÁT	PROPANOL	I-BUTANOL	I-AMILACETÁT	I-AMILALKOHOL	DIACETIL	2,3-PENTÁNDION
	mg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
SACCHAROMYCES EXIGUUS									
1:12	17,2	9	1,8	5,3	4,5	0,26	25,5	74	51
1:15	17,3	7	1,8	5,4	4,6	0,29	26,8	84	59
1:17	18,7	11	2,2	6,3	5,0	0,34	29,7	104	79
1:20	16,7	9	1,8	6,4	5,3	0,28	29,2	105	86
TORULASPORA DELBRUECKII									
1:12	17,8	14	4,4	6,8	4,7	0,23	28,3	714	125
1:15	12,9	9	4,8	7,3	4,5	0,26	27,8	737	147
1:17	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1:20	17,8	14	5,4	10,9	5,0	0,26	31,2	803	221
SACCHAROMYCES DELBRUECKII									
1:12	14,2	7	4,7	9,4	6,5	0,52	36,3	109	79
1:15	15,3	4	2,9	7,4	5,9	0,27	32,6	108	67
1:17	17,6	9	7,0	14,6	8,7	0,7	50,2	107	103
1:20	11,9	5	6,3	13,4	8,2	0,63	47,6	92	71
SACCHAROMYCODES LUDWIGII									
1:12	9,4	5	2,6	5,2	14,7	0,07	31,1	59	17
1:15	6,8	4	2,7	5,4	16,0	0,07	34,3	62	17
1:17	6,4	7	2,8	5,4	15,7	0,06	33,7	65	19
1:20	7,0	9	3,2	5,4	15,9	0,08	33,6	72	19
<i>S. cerevisiae</i> (ipari viszonyok között)*	13,2	18	8,6	20,3	20,6	0,9	78,2	255	392

* MISINSZKI 2000

21.táblázat Aroma anyagok koncentrációja az utóerjesztés után

	ACETALDEHID	DMS	ETIL- ACETÁT	PROPANOL	I-BUTANOL	I-AMILACETÁT	I-AMILALKOHOL	DIACETIL	2,3-PENTÁNDION
	mg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
SACCHAROMYCES EXIGUUS									
1:12	3,0	10	5,4	8,3	6,2	0,55	38,4	75	38
1:15	1,3	2	4,2	5,8	5,0	0,4	32,0	56	19
1:17	4,0	6	4,2	9,3	6,0	0,39	37,6	63	29
1:20	16,9	4	3,3	9,0	6,3	0,49	35,4	70	55
TORULASPORA DELBRUECKII									
1:12	6,0	6	8,6	11,6	6,2	0,56	41,6	302	63
1:15	5,4	8	9,4	10,0	5,6	0,56	37,8	271	54
1:17	18,9	8	9,2	11,2	6,0	0,56	38,9	373	90
1:20	13,3	8	5,8	8,9	5,1	0,29	32,4	352	70
SACCHAROMYCES DELBRUECKII									
1:12	5,0	6	9,2	NA	NA	0,77	43,4	79	57
1:15	1,6	3	7,1	10,8	7,1	0,57	41,0	66	29
1:17	7,8	5	12,5	16,1	10,5	1,1	55,1	42	46
1:20	11,9	4	11,6	15,2	9,6	1,1	50,9	49	48
SACCHAROMYCODES LUDWIGII									
1:12	4,0	3	3,2	7,2	15,9	0,18	37,6	49	12
1:15	1,5	1	3,0	7,5	15,6	0,2	38,2	56	12
1:17	0,5	3	3,3	7,0	16,7	0,18	39,0	46	9
1:20	16,9	2	3,6	6,7	16,0	0,12	35,5	36	14
<i>irodalmi adat*</i>	<i>2-10</i>	<i><100</i>	<i>10-40</i>	<i>7-16</i>	<i>5-20</i>	<i>0,1-7,0</i>	<i>30-70</i>	<i><100</i>	<i><50</i>

*KRÜGER&ANGER 1990

Az itt látható adatok alapján a *Saccharomyces delbrueckii* is ígéretes jelölt lenne egy kevert kultúras erjesztéssel készülő termékhez. Különösen az észterek – etil-acetát és izo-amilacetát – mennyisége kiemelkedő – természetesen nem a sörélesztőhöz, hanem a másik három idegen élesztőhöz képest. Az előbbieken bemutatott „magas” alkohol koncentráció miatt azonban az általam kitűzött célokhoz nem lenne alkalmas.

A *S. exiguus* és *T. delbrueckii* élesztők is viszonylag jó arányban és mennyiségben termeltek aroma anyagokat, ám esetükben is az etanol koncentrációjával van a probléma. Az utóbbi törzsnél kiemelendő – negatív értelemben – a diacetil különösen nagy koncentrációja, mely az utóerjesztés után sem csökkent megfelelő mértékben.

A *Saccharomyces ludwigii* a kevés etanol mellett elfogadható mennyiségben termelt aroma anyagokat is, és külön kiemelendő az alacsony diacetil koncentráció a végtermékben.

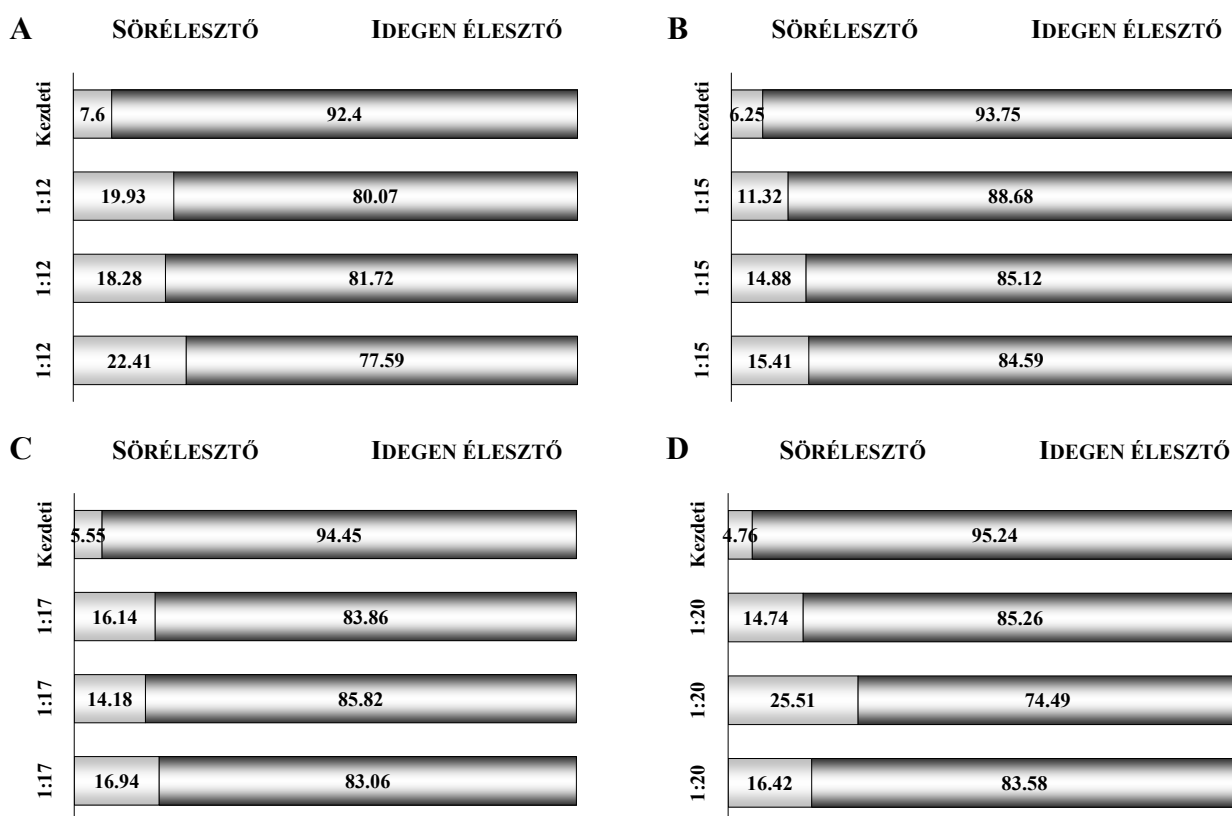
Amint a fejezet elején említettem, ezzel a kísérlet sorozattal az volt a célom, hogy a rendelkezésemre álló speciális élesztők közül –, amelyek nem erjesztenek maltózt - kiválasszam azt (vagy azokat), amelyet a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő törzsszel kevert kultúrában alkalmazva alacsony alkoholtartalmú (< 2V/V%) terméket eredményez. Feltétel volt, hogy a termék aromái a hagyományos sör aromáival összevethetők legyenek.

Ezen kritériumoknak a *Saccharomyces ludwigii* élesztő felelt meg. Úgy találtam, hogy ha a kezdeti *S. cerevisiae:S'codes ludwigii* arány 1:10 és 1:20 között van, akkor az utóerjesztést követően egy alacsony etanol tartalmú és megfelelő aroma anyagokat hordozó terméket kapok.

A keverési arány pontosítása érdekében újabb erjesztési kísérletet végeztem.

5.2.2.5 IV. erjesztési kísérlet. Kevert kultúras erjesztés *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztővel és *Saccharomyces ludwigii* élesztővel

A következő fermentációkban tehát már csak a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő és a *Saccharomyces ludwigii* élesztő vett részt. 300 ml steril sörlevet oltottam be 1:12, 1:15, 1:17 és 1:20 arányú keverék kultúrával. Az idegen élesztő kezdő sejtkoncentrációja 1×10^7 sejt/ml volt, a sörélesztő pedig arányosan kevesebb. A főerjesztés 7 napig 8°C-on, majd a sejtek eltávolítása után az utóerjesztés 14 napig 0°C-on zajlott. Minden arány esetében 3 párhuzamos erjesztést végeztem. Ezzel az ismétlés jellegű kísérlettel azt vizsgáltam, hogy az előző erjesztések során kapott eredmények mennyire reprodukálhatók. (A Melléklet IV. táblázatában az erjesztések kezdeti és végső sejtkoncentrációi, illetve *S. cerevisiae*:*S. codes ludwigii* százalékos sejtarányai összegezve is megtalálhatók.)



29.ábra. Élesztősejtek aránya az erjesztés végén 1:12 (A), 1:15 (B), 1:17 (C) és 1:20 (D) sörélesztő : idegen élesztő kezdeti sejtarányánál

22.táblázat Etanol koncentrációk a főerjesztés és utóerjesztés végén

		ETANOL KONCENTRÁCIÓ V/V%	
		FŐERJESZTÉS VÉGÉN	UTÓERJESZTÉS VÉGÉN
<i>S. cerevisiae</i> : <i>S'codes ludwigii</i>	1:12	0,98	1,40
	1:12	1,41	1,59
	1:12	1,07	1,37
	1:15	1,02	1,37
	1:15	1,26	1,32
	1:15	1,19	1,30
	1:17	1,09	1,23
	1:17	1,23	1,27
	1:17	1,31	1,36
	1:20	1,09	1,38
	1:20	0,97	1,07
	1:20	1,05	1,30

Mérési adataimat összegezve megállapítottam, hogy a korábbi erjesztések eredményei a főerjesztés után mért sörélesztő:idegen élesztő arányokat, valamint az etanol koncentrációkat tekintve reprodukálhatónak bizonyultak (29. ábra, 22. táblázat). Amennyiben a beoltáskor 12-20-szor több *Saccharomyces ludwigii* élesztőt alkalmaztam, mint *S. cerevisiae* élesztőt, akkor a főerjesztés során mintegy „kontroll” alatt tartotta az idegen élesztő a sörélesztőt. Ennek megfelelően az alkohol koncentrációja a végtermékben 1,5 V/V% alatt maradt.

5.3 ÉLESZTŐ TÖRZSEK KÖZÖTTI KÖLCSÖNHATÁS VIZSGÁLATA

Munkám előző fejezetében azt tűztem ki célul, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő törzs és egy idegen élesztő törzs megfelelő arányú keverékével úgy tudjak sörlevet erjeszteni, hogy az alkoholtartalom 2 V/V% alatt maradjon, a kapott termék pedig olyan aromákat hordozzon, ami hagyományos sörre emlékeztet. Több idegen élesztő törzset megvizsgáltam, végül a *Saccharomyces ludwigii* élesztő felelt meg a szempontoknak. A kevert kultúras erjesztések azt az eredményt hozták, hogy amennyiben a *S. codes ludwigii* élesztő 1:10 vagy annál nagyobb arányban van jelen a kezdeti kevert kultúrában, úgy a *S. cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő nem képest azt túlnőni. Történt ez – számos ismétlés alkalmával – annak ellenére, hogy az erjesztés közege sörlé volt, ami a sörélesztő számára ideális tápközegnek tekinthető. Ebből arra következtettem, hogy valamiféle kölcsönhatás van a két élesztő sejtjei között.

Kísérleti munkámnak ebben a részében a sörélesztő és idegen élesztő közötti interakciót vizsgáltam.

Az alábbi szempontok vezéreltek:

- *Szénhidrát felvétel.* A *S. codes ludwigii* élesztő nem hasznosítja a maltózt, és a maltotriózt is csak csekély mértékben. E két cukor jelentős mennyiségben van jelen az általam alkalmazott erjesztési közegben. A glükóz és a fruktóz az a két erjeszhető szénhidrát, amely mindkét élesztő számára hasznosítható, így feltételezhetően versengenek értük.
- *Toxikus vegyület jelenléte.* Egy olyan élesztővel kapcsolatban, mint a *Saccharomyces ludwigii* –, ami borok erjesztésekor fordul elő – felmerül, hogy killer aktivitással rendelkezik. Ezt is megvizsgáltam, mint lehetséges okot a korábban tapasztaltakra. Természetesen a killer toxin mellett más vegyület is gátolhatja a szaporodás sebességét, pl. a közepes szénláncú zsírsavak (NISSEN et al 2003).
- *Sejt-sejt kapcsolat.* Magasabb rendű eukariótáknál más sejtek jelenléte, megjelenése befolyásolhatja, hogy egy adott sejt folytatja a növekedést vagy nem. Nissen és munkatársai több cikkben is arra keresték a választ, hogy élesztőknél is előfordulhat-e ez a jelenség (NISSEN et al 2003, NISSEN&ARNEBORG 2003). Vizsgálataik szerint a sejt-sejt kontaktus okozza a *Kluyveromyces thermotolerans* és a *Torulaspora delbrueckii* szaporodásának megállását ha *Saccharomyces cerevisiae* borélesztővel kerülnek kevert kultúrába.

Munkámban kevert kultúras erjesztéseket végeztem, nyomon követtem a sejtek koncentrációjának változását és a szénhidrátok felhasználását. Megvizsgáltam, hogy a *Saccharomyces ludwigii* rendelkezik-e killer aktivitással – a *S. cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő vagy más élesztővel szemben. Továbbá azt is tanulmányoztam, hogy a két élesztő sejtjei csak egymás jelenlétében hatnak egymásra (az idegen élesztő a sörélesztőre), vagy valamely vegyület termelésével.

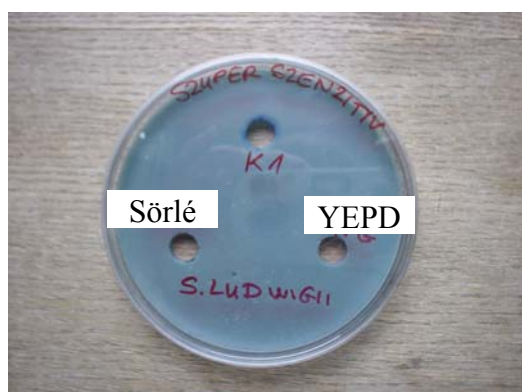
5.3.1 A *Saccharomyces ludwigii* élesztő killer aktivitásának vizsgálata

Az idegen élesztő killer aktivitását többféleképpen is megvizsgáltam. Minden esetben a *S. cerevisiae* WS 34/70 sörélesztőt és a *S. cerevisiae* S6 szuperszenzitív élesztőt alkalmaztam teszt élesztőként. Természetesen arra kerestem választ, hogy a sörélesztővel szemben aktív-e a toxinja – ha egyáltalán termel ilyen vegyületet – vagy nem. Egy korábbi vizsgálatban bebizonyosodott, hogy van olyan killer toxin, amire ez a sörélesztő törzs rezisztens. Ezért a szuperszenzitív élesztő arra az esetre szükséges, ha ebben a vizsgálatban is ez történne.

Agar diffúziós módszert alkalmaztam a kísérletekben. Két tápközeget használtam, amiben megpróbáltam toxint termeltetni. Egyrészt sörlevet, ami a korábbi vizsgálatokban szerepelt, másrészt YEPD tápközeget. Erre azért volt szükség, mert ez utóbbiban a glükóz az egyedüli szénforrás, amit a *S. cerevisiae* maradéktalanul hasznosítani tud. A sörlemben a szaporodásának sebessége módosulhat a jelenlévő szénhidrátok miatt, ami befolyásolhatja a toxin termelést is.

Végül pedig, a vizsgálatokat úgy is elvégeztem, hogy az idegen élesztő sejteket a metilénkékes agaron masszívan leoltott teszt élesztőkre kacsál húztam ki. Azért éreztem szükségét ennek a módszernek, mert ha csak kevés toxint termel az idegen élesztő, akkor a nagy koncentrációban jelen lévő sejtekkel kimutatható az aktivitása, míg esetleg a felülúszóban nem jelenik meg olyan mennyiségben, hogy hatása látható legyen.

Az első képen a sörlemből és a YEPD tápközegből nyert felülúszók vizsgálata látható. A teszt élesztő a *S. cerevisiae* S6 szuperszenzitív törzs volt. Kontrollként a K1 típusú toxint termelő *S. cerevisiae* ATCC 46305 törzset használtam (30. ábra).



30.ábra. *Saccharomyces ludwigii* élesztő killer aktivitásának vizsgálata agar diffúziós módszerrel

A vizsgálat szerint a *Saccharomyces ludwigii* sem YEPD tápközegben, sem sörlemben nem termelt kimutatható mennyiségű toxint. Feltisztulási zónát csak az ismert toxin termelő élesztő sejt képzett (K1).

A kísérletet megismételtem úgy, hogy kacsál húztam ki az idegen élesztő sejteit. Ez alkalommal a *S. cerevisiae* WS 34/70 törzs is szerepelt teszt élesztőként (31/a és b ábra). Kontrollként azt a három

killer élesztőtörzset használtam, amit korábban a protoplaszt fúzióban is alkalmaztam: *S. cerevisiae* ATCC 46305 (K1 típusú), *S. cerevisiae* NCYC 738 (K2 típusú) és *S. cerevisiae* K7 (K1 típusú).



31/a. és b. ábra. *Saccharomyces ludwigii* élesztő killer aktivitásának vizsgálata

A két kép tanúsága szerint a *S. cerevisiae* élesztő nem képezett feltisztulási zónát. Az elvégzett vizsgálatokból arra következtettem, hogy a *Saccharomyces ludwigii* élesztő nem termel toxint.

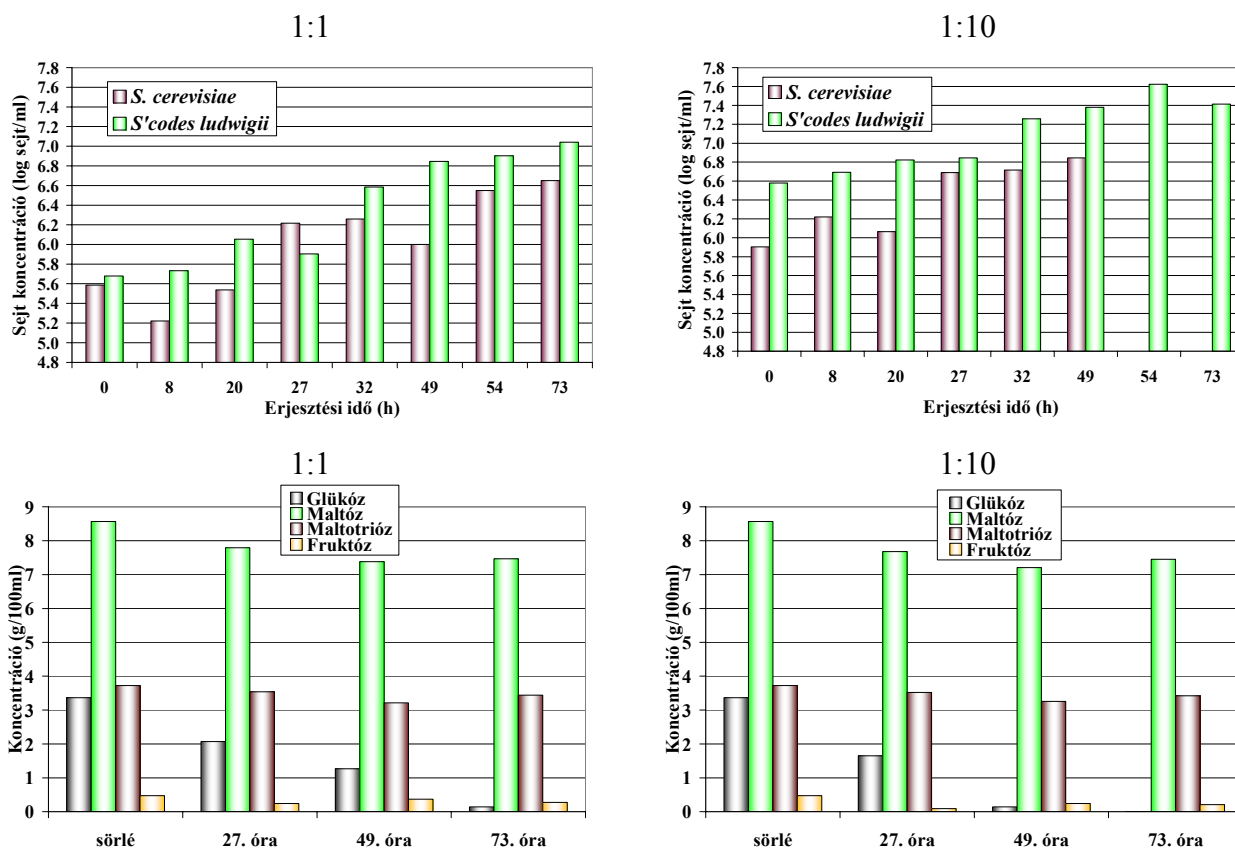
5.3.2 A *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő és a *Saccharomyces ludwigii* élesztő kölcsönhatásának vizsgálata kevert kultúrák erjesztésekkel

A kevert kultúrák erjesztéseket a 4.2.5.2 fejezetben leírt módon végeztem. A korábbi vizsgálatokhoz képest módosítottam a sörélesztő sejtek és idegen élesztő sejtek kimutatásának módszerén. Ez alkalommal NISSEN és munkatársai (2003) által leírt telepszámlálással állapítottam meg a sejtek koncentrációját (4.5.2 fejezet). A lizin agaron csak a *S. cerevisiae* sejtek nőnek ki, míg a YEPD agaron mindkét élesztő sejtjei. Így az idegen élesztő sejt koncentrációját direkt módon kaptam meg. A sörélesztő sejt koncentrációját indirekt módon: kivonva a lizin agaron kapott eredményt a YEPD agaron kapott eredményekből. A minták szénhidrát tartalmát HPLC-n határoztam meg.

Az élesztők kölcsönhatását két különböző hőmérsékleten tanulmányoztam: 8°C-on és 20°C-on.

5.3.2.1 Kölcsönhatás vizsgálat 8°C-on. I. erjesztési kísérlet

Ezen a hőmérsékleten két kezdő sörélesztő:idegen élesztő koncentráció arányt állítottam be: 1:1 és 1:10. Az 32. ábrán a 73 órás erjesztés során tapasztaltak láthatók.



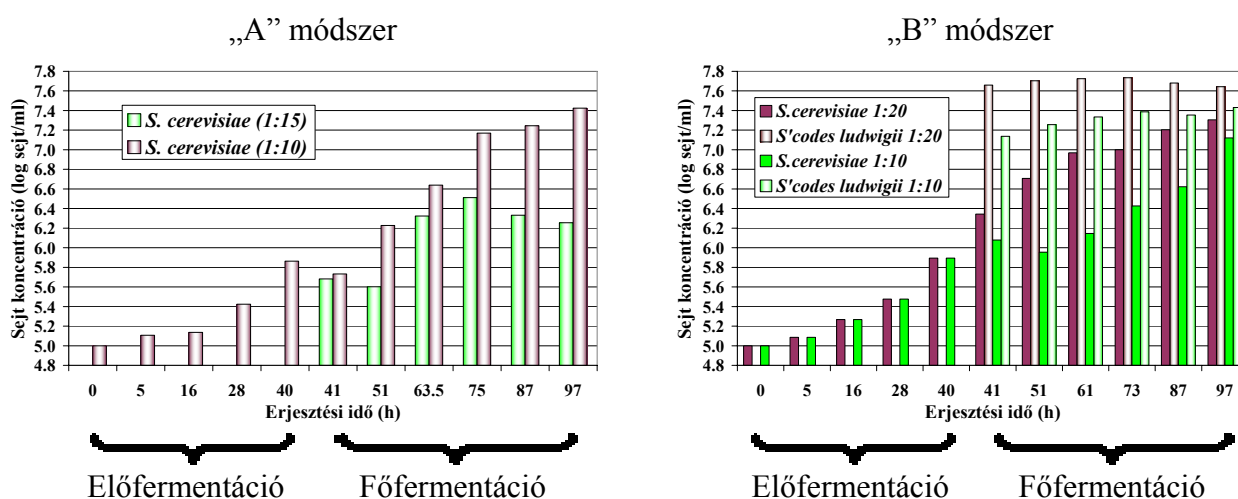
32.ábra. A sörélesztő és az idegen élesztő sejtkoncentrációjának alakulása valamint a szénhidrátok mennyiségének változása 1:1 és 1:10 kezdő sejtarányoknál

Az eredmény várakozásaimmal ellentétben alakult az 1:1 kezdő aránynál. A korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a sörélesztő egyenlő kezdő sejtszám esetén túlsúlyba kerül az idegen élesztővel szemben. Ebben az esetben 73 óra után a *S'codes ludwigii* élesztő nagyobb arányban volt jelen. A szénhidrát vizsgálat eredményéből úgy tűnik, hogy a glükóz felhasználásából az idegen élesztő profitált a erjesztés alatt. Ezt a fermentációt nem követtem tovább, de nem kizárható, hogy a sörlében maradt maltózt és maltotriózt felhasználva a sörélesztő a továbbiakban még növekedne, míg az idegen élesztő sejtszáma stagnálna.

Az 1:10 kezdő sejtaránynál az első 49 órában nagyon hasonlóan alakult a sörélesztő és idegen élesztő sejtkoncentrációja. A következő két mintavételnél azonban már *S. cerevisiae* sejteket nem mutatott ki a vizsgálat. A szénhidrátok maradék mennyisége a tápközegben alátámasztotta az eredményeket. A korábbi erjesztéskor azt az eredményt kaptam, hogy a sörélesztő sejtek ennél a kezdő sejtaránynál már visszaszorultak az egy hetes erjesztés végére, mindössze a sejtek 20%-át adták.

5.3.2.2 Kölcsönhatás vizsgálat 8°C-on. II. erjesztési kísérlet

A két élesztőtörzs sejteinek kölcsönhatását egy más jellegű kísérletben is megvizsgáltam. A kölcsönhatás vizsgálatok folyamatábráját a 4.5.4 fejezetben helyeztem el. Az egyik vizsgálat (ezt „A” módszernek neveztem el) lényege, hogy egy kevert kultúra felülúszóját hozzáadtam monokultúras sejtekhez. Jelen esetben a kevert kultúrák 1:10, illetve 1:15 arányban tartalmaztak sörélesztőt és idegen élesztőt (33. ábra). A „B” módszerben élő *Saccharomyces ludwigii* sejteket adtam hozzá *Saccharomyces cerevisiae* kultúrához úgy, hogy a sörélesztő:idegen élesztő arány 1:10, illetve 1:20 legyen (33. ábra). A vizsgálatok első felében – az előfermentáció során – mindkét módszernél a sörélesztők sejtkoncentrációját követtem. A második szakaszban – a főfermentációban – az „A” módszernél csak a sörélesztőt vizsgáltam (hiszen idegen élesztő már nem volt jelen), míg a „B” módszer esetében mindkét élesztő sejtszámát vizsgáltam.



33.ábra. Sörélesztő és idegen élesztő sejtek kölcsönhatásának vizsgálata különböző módszerekkel

Az „A” módszer arra alkalmas, hogy megállapítsuk, termel-e olyan vegyület a kevert kultúrában az idegen élesztő, ami utána – megmaradva a tápközegben – befolyásolhatná a *S. cerevisiae* szaporodását. A 33. ábrán látható sejtkoncentráció változás a két vizsgálatnál azt mutatja, hogy ha az előfermentáció során nagyobb mennyiségben (1:15) volt jelen az idegen élesztő, akkor a főfermentáció során a sörélesztő nem növekedett olyan ütemben, mint a kisebb aránynál (1:10). Korábbi kísérletekkel tisztáztam, hogy killer toxin nem állhat a jelenség hátterében, de más vegyület jelenlétét – amit a bevezetőben is említettem – nem tudtam sem igazolni, sem kizárni. További lehetőség, hogy az előfermentáció során a tápközeg egy vagy több fontos alkotója annyira elfogyott, hogy ez akadályozta a főfermentáció során a sörélesztő szaporodását. Az erjeszhető szénhidrátok mennyiségének változását bemutató ábra a Mellékletben található (I. és II. ábra)

A „B” módszerrel azt lehet megvizsgálni, hogy az egyik sejt (ebben az esetben az idegen élesztő) jelenléte – megjelenése – a tápközegben hogyan befolyásolja a másik sejt (itt a sörélesztő) szaporodását. A főfermentáció során a *S'codes ludwigii* élesztő nem mutatott jelentősebb szaporodást egyik keverési aránynál sem, annak ellenére, hogy a szénhidrátok mennyisége alapján erre lett volna alkalma, mert az előfermentáció során a *S. cerevisiae* sörélesztő nem használta fel a glükózt és fruktózt teljes mértékben. Az idegen élesztő sejtek megjelenése a tápközegben úgy tűnik, nem befolyásolta a sörélesztő szaporodását. Ugyan a *S'codes ludwigii* sejtek nagyobb aránya megmaradt a kísérlet végéig, ám csökkenő mértékben. A glükózt és fruktózt ekkorra szinte teljesen felhasználták az élesztők, ám a maltózból és maltotriózból csekély mennyiség fogyott. Elképzelhető, hogy ebben áttételesen szerepe lehet az idegen élesztőnek. A lényegesen, 10-20-szor nagyobb mennyiségű *S'codes ludwigii* sejtek felhasználhattak olyan tápközeg összetevőt, ami ily módon befolyásolja a másik élesztő növekedését. A Melléklet III. és IV. ábrája a szénhidrátok mennyiségének csökkenését mutatja be.

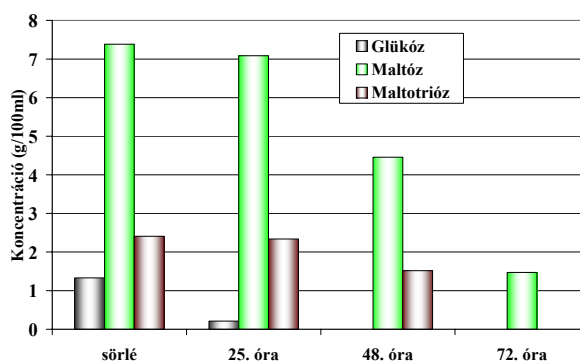
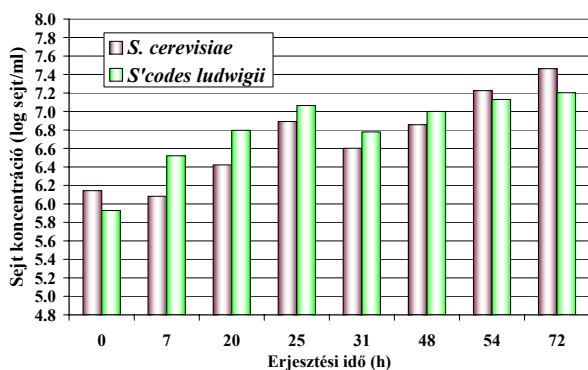
5.3.2.3 Kölcsönhatás vizsgálat 20°C-on. I. erjesztési kísérlet

Az élesztők növekedését a hőmérséklet befolyásolja. Az előző alfejezetben ismertetett kölcsönhatás vizsgálatokat megismételtem magasabb hőmérsékleten – 20°C-on – hogy a kevert kultúrák esetében megállapítsam a hőfok hatását.

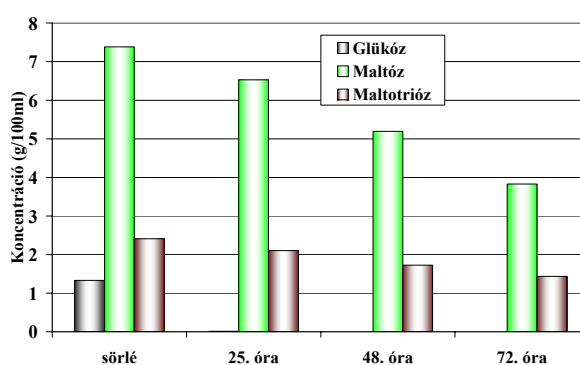
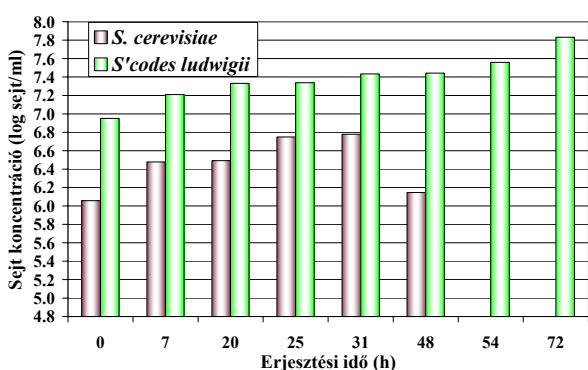
SEJTKONCENTRÁCIÓK

SZÉNHYDRÁT ANALÍZISEK EREDMÉNYEI

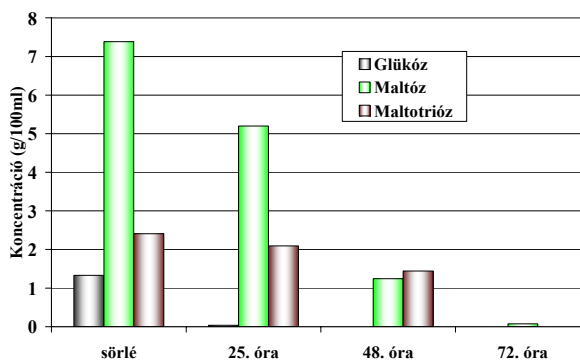
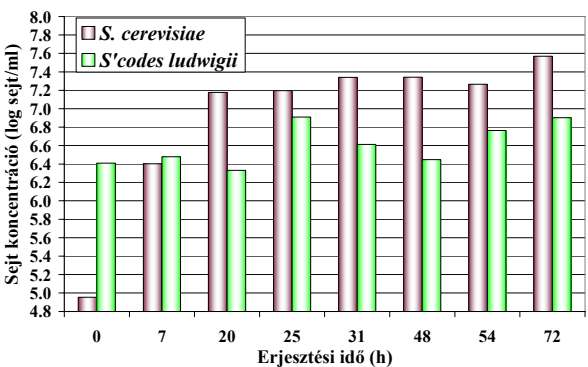
1:1



1:10



10:1



34.ábra. A sörélesztő és az idegen élesztő sejtkoncentrációjának alakulása, valamint a szénhidrátok mennyiségének változása 1:1, 1:10 és 10:1 kezdő sejtarányoknál

Az eredmények értékelése előtt azt gondoltam, hogy a magasabb hőmérséklet kedvezni fog a *S. cerevisiae* sörélesztőnek, mert a monokultúrás erjesztésben intenzívebb szaporodást mutatott, mint a *S'codes ludwigii* élesztő ezen a hőfokon.

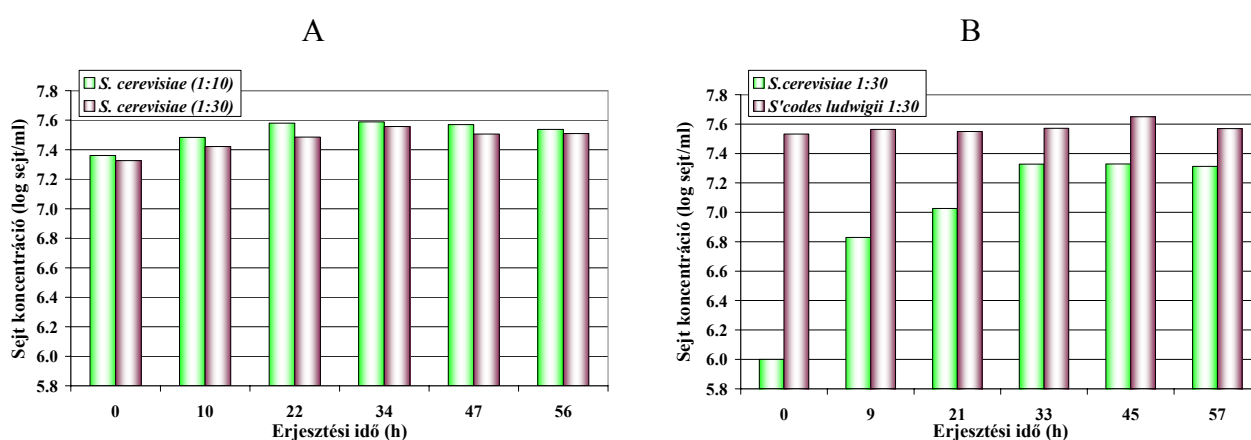
Az eredmény az 1:1 sejtarányal indított erjesztés esetében megfelelt a várakozásomnak (34. ábra). A sörélesztő és idegen élesztő sejtek aránya megközelítőleg 2:1-hez volt az erjesztés végén. A fermentáció folytatásában valószínűleg tovább is növekedett volna még a sörélesztő sejtszáma, tekintettel arra, hogy a maltózt 72 óra alatt nem használta fel maradéktalanul.

Abban az esetben, ha a *S'codes ludwigii* kezdő sejtszáma 10-szerese volt a sörélesztőének, a 72 órás fermentáció 48. órájában már egész kis koncentrációban volt csak kimutatható ez utóbbi. A 8°C-on tapasztaltakhoz képest az idegen élesztő szaporodása intenzívebb volt (34. ábra).

Ez alkalommal úgy is elvégeztem a vizsgálatot, hogy a sörélesztő kezdő sejtkoncentrációja volt 10-szerese az idegen élesztő kezdő sejtszámának. A sörélesztő jó ütemben szaporodott azonban – ellentétben az 1:10 kezdő sejtarányú vizsgálattal, ahol a sörélesztő a fermentáció végén nem volt kimutatható – itt a *S'codes ludwigii* sejtek végig jelen voltak, és ha kisebb mértékben is, de koncentrációjuk a kezdeti értékhez képest növekedett. A szénhidrát analízis szerint a 48. órára már kimerítették az élesztők a tápanyag glükóz készletét, ezért sem növekedhetett tovább a maltózt nem hasznosító idegen élesztő sejtkoncentrációja. A fermentáció utolsó 24 órájában a *S. cerevisiae* élesztő viszont még fel tudta használni a sörlé maradék maltóz és maltotrióz tartalmát (34. ábra).

5.3.2.4 Kölcsönhatás vizsgálat 20°C-on. II. erjesztési kísérlet

Az alacsonyabb hőmérsékleten végzett kísérletekhez hasonlóan, most is megvizsgáltam, hogy a idegen élesztő arányának növelése milyen hatással van a sörélesztőre. Ez alkalommal az „A” módszert 1:10 és 1:30 arányú sörélesztő:idegen élesztő kevert kultúrával, míg a „B” módszert 1:30 sejtaránnyal hajtottam végre (35. ábra).



35.ábra. Sörélesztő és idegen élesztő sejtek kölcsönhatásának vizsgálata különböző módszerekkel

Az „A” módszernél – aminek az eredménye arra utalhat, hogy az előfermentáció során került-e olyan vegyület a tápközegbe, ami a főfermentációban befolyásolhatja a sörélesztő növekedését – azt tapasztaltam, hogy az előfermentációban alkalmazott sejtarány hatással lehetett a *S. cerevisiae* szaporodására. Az előfermentáció során a glükózt és fruktózt felhasználták az élesztők, ám a maltóznak mintegy fele, a maltotrióznak egyharmada még rendelkezésére állt a sejteknek. A főfermentáció végére minden erjeszhető szénhidrát elfogyott a tápközegből, de ez a sejtszámot nem

növelte jelentősen. Az erjeszhető szénhidrátok koncentrációjának csökkenése a Melléklet V. és VI. ábráján látható.

A „B” módszer esetében a főfermentáció során a sörélesztőhöz nagy feleslegben adott *S'codes ludwigii* sejtszáma nem változott, a sörélesztő azonban szaporodott. A szaporodás azonban lehetett volna intenzívebb is, ám a maltóz és maltotrióz közel fele felhasználatlanul maradt a tápközegben (Melléklet VII. ábra).

5.3.3 A kölcsönhatás vizsgálatok eredményeinek összefoglalása és értékelése

A *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő és a *Saccharomyces ludwigii* élesztő kölcsönhatását vizsgáltam munkámnak ebben a részében. Az előző fejezetben ismertetett kevert kultúras erjesztések során – melyeket sörlében végeztem – azt tapasztaltam, hogy ha a sörélesztő-idegen élesztő kezdő sejtszáma 1:10 vagy ennél nagyobb volt, akkor a *S. cerevisiae* sörélesztőt túlnötte az idegen élesztő. A jelenség azért volt érdekes számomra, mert a sörélesztőnek ideális tápközeg a sörlé, míg a maltózt nem hasznosító *S'codes ludwigii* élesztőnek nem.

Kölcsönhatásukat vizsgálva először az idegen élesztő killer aktivitását térképeztem fel. Killer toxin – ha kis mennyiségben van jelen – esetleg okozhatja a szaporodás gátlását. A *Saccharomyces ludwigii* élesztő egyike annak a számos nem-*Saccharomyces* élesztő fajnak, amelyek a must spontán erjesztésében részt vesznek. Minthogy ezek között számos törzs rendelkezik killer aktivitással, és erről nem találtam információt a szakirodalomban, feltételeztem, hogy az általam használt *S'codes ludwigii* is termelhet toxint. A metilénkékes táptalajon agar diffúzióval elvégzett vizsgálatok azonban nem utaltak killer aktivitásra sem a *S. cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő, sem a *S. cerevisiae* S6 szuperszenzitív élesztővel szemben. Ezt a feltételezést tehát elvettem.

A továbbiakban kevert kultúras erjesztéseket végeztem 8 és 20°C-on, különböző kezdő sörélesztő:idegen élesztő sejtarányokkal (1:1, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, ill. 10:1), nyomon követtem a sejtszámok alakulását és a szénhidrátok felhasználását. Alkalmaztam olyan módszert („A” módszer), ami azt mutatja ki, ha a nem-*Saccharomyces* olyan jellegű vegyületet termel, ami lassítja a sörélesztő szaporodását, és olyan módszert is („B” módszer), ami a sejt-sejt kontaktus szaporodást szabályozó szerepét vizsgálja.

Ez utóbbi nem hozott olyan eredményt, ami magyarázná az általam tapasztaltakat.

Feltételezésem szerint a jelenségnek két magyarázata lehet. (1) A nem-*Saccharomyces* élesztő termel olyan vegyületet, ami lassítja a sörélesztő növekedését. (2) A nem-*Saccharomyces* törzs nagyobb szükséglete révén (NISSSEN et al. 2003) kimeríti a tápanyagnak egy olyan komponensét, ami a sörélesztő normális szénhidrát-felvételéhez, anyagcseréjéhez szükséges, aminek hiányában szaporodása lassul.

Az első feltételezés igazságának kiderítéséhez részletes analitikai vizsgálatokra lenne szükség. A közepes szénláncú zsírsavak közül a kaprilsav (oktánsav) és kaprinsav (dekánsav) gátló hatását a *Saccharomyces* élesztőkre BISSON (1999) és VIEGAS és munkatársai (1989) is hangsúlyozták, megjegyezve azt is, hogy a nem-*Saccharomyces* élesztők szintetizálnak ilyen vegyületeket.

A második esetben is behatóan kellene tanulmányozni a sörélesztő szénhidrát-anyagcseréjét, elsősorban a maltóz és maltotrióz felvételét befolyásoló tényezőket. RAUTIO és LONDESBOROUGH (2000) a maltóz transzporter aktivitását vizsgálták sörerjesztés alatt.

Az erjedést és élesztő szaporodást gátló tényezők közül a nitrogén hiány az egyik, amit említenek, és ugyanez megjelenik a borélesztőknél is, mint a glükóz felvételét befolyásoló faktor (MCCLELLAN et al. 1989). A sörélesztőknél nitrogén hiány esetén a tápközegben lévő glükóz indukál egy folyamatot, ami a maltóz transzporterek inaktiválását eredményezi. Ebben az esetben nem csak akadályoztatva van az új maltóz transzporterek szintézise, hanem a már létező transzporterek is eltűnnek (RAUTIO&LONDESBOROUGH 2000).

BISSON (1999) összefoglaló cikkében leírta, hogy a kevert kultúrák fermentációk vitamin szükséglete a szokásosnál nagyobb. A vitaminok nagyobb fogyását eredményezi, ha alacsony hőmérsékleten végeznek *Saccharomyces* és nem-*Saccharomyces* élesztők keverékével erjesztést. Az alacsonyabb hőmérséklet (amit a cikkben nem nevez meg pontosan) a nem-*Saccharomyces* élesztőknek kedvez, és ez szintén a vitaminok gyors fogyáshoz vezet, lelassítva ezzel a *Saccharomyces* élesztő további fermentációs tevékenységét.

Ezek alapján a nitrogén vegyületek és a vitaminok mennyiségének változását lenne érdemes nyomon követni a sörlé kevert kultúrák erjesztése alatt is, ami választ adhatna arra a kérdésre, hogy milyen módon hat a *Saccharomycodes ludwigii* idegen élesztő törzs a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő törzs szaporodására és erjesztési képességeire.

5.4 BIOTECHNOLÓGIAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA

ALKOHOLSZEGÉNY SÖRÖK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

Napjainkban az alkoholmentes és alkoholszegény sörök gyártásának technológiája általában két módszerrel történik. Egyfelől a normál erjesztési technológiával előállított sörből evaporációval, dialízissel vagy reverz ozmózissal távolítják el az alkoholt (KUNZE 1999, PILIPOVIK&RIVEROL 2005). Másfelől ún. megszakított erjesztést végeznek, amikor vagy nagyon rövid érintkeztetési idő (0,5-8 óra) és magas hőmérsékletet (15-20°C), vagy kicsit hosszabb érintkeztetési időt (24 óra) és alacsony hőmérsékletet (0-5°C) alkalmaznak (VAN IERSEL et al. 1998).

Kísérletei munkámban két másik módszert alkalmaztam, melyeket az előző fejezetekben ismertetett vizsgálatokkal és az ott kapott eredményekkel alapoztam meg.

5.4.1 *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztőt és *Saccharomyces ludwigii* élesztőt tartalmazó keverék kultúra alkalmazása alkoholszegény sör előállítására

A **speciális élesztők** alkalmazását, melyek a sörélesztőtől eltérő szénhidrát hasznosításuk révén (elsősorban a maltózt nem erjesztik) termelnek kisebb mennyiségben alkoholt, említik a szakirodalomban (KUNZE 1999), ám gyakorlati alkalmazásukról üzemi méretekben nincs tudomásom.

Kísérleti munkámban több ilyen maltóz negatív élesztőtörzzsel (4.1.1. fejezet) és egy sörélesztő törzzsel (*Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70) végeztem kevert kultúras erjesztéseket. Célom volt, hogy megállapítsam melyik speciális élesztő eredményez kis alkoholtartalmú terméket kedvező, sörre jellemző aroma összetétellel. Ezt követően arra kerestem választ, hogy milyen arányban tartalmazza a kétféle élesztőt a starterkultúra.

Az eredmények alkalmazásával a továbbiakban célul tűztem ki (1) a sörélesztő törzs és a *Saccharomyces ludwigii* törzs kezdő arányának pontosítását, (2) módosított szénhidrát összetételű sörlé előállítását, (3) laboratóriumi méretekben sör előállítását.

5.4.1.1 Kevert kultúras erjesztés *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztővel és *Saccharomyces ludwigii* élesztővel

A következő fermentációkban tehát már csak a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő és a *Saccharomyces ludwigii* élesztő vett részt. 300 ml steril sörlévet oltottam be 1:12, 1:15, 1:17 és 1:20 arányú keverék kultúrával. A idegen élesztő kezdő sejtkoncentrációja 1×10^7 sejt/ml volt, a sörélesztőé pedig arányosan kevesebb. A főerjesztés 7 napig 8°C-on, majd a sejtek eltávolítása után az utóerjesztés 14 napig 0°C-on zajlott. Az erjesztéseket minden arány esetében 3 párhuzamosban végeztem. A 5.2.2.5. fejezetben már ismertettem, hogy a főerjesztés végén milyen sejtarányokat

tapasztaltam. A 23. táblázatban az erjesztés végén mért alkohol és aroma anyag koncentrációkat ismertetem.

23.táblázat Etanol és aroma anyag koncentrációk az utóerjesztés végén

	ETANOL	ACETALDEHID	DMS	ETIL ACETÁT	PROPANOL	I-BUTANOL	I-AMILACETÁT	I-AMILALKOHOL	DIACETIL	2,3- PENTÁNDION
	V/V%	mg/l	µg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	µg/l	µg/l
SACCHAROMYCODES LUDWIGII										
1:12	1,40	15,2	0	3,1	4,7	11,6	0,3	33,4	43	12
1:12	1,59	10,8	4	3,9	4,5	11,7	0,13	35,2	46	14
1:12	1,37	8,1	2	3,7	4,0	10,9	0,2	31,5	42	11
1:15	1,37	6,9	2	3,2	3,9	10,7	0,4	30,5	38	9
1:15	1,32	9,8	2	3,2	4,1	11,1	0,4	32,7	39	10
1:15	1,30	7,7	5	3,2	4,0	10,6	0,3	30,0	39	9
1:17	1,23	6,4	1	4,0	3,8	10,3	0,2	29,1	36	9
1:17	1,27	7,0	6	3,5	3,8	10,7	0,2	30,0	37	9
1:17	1,36	7,1	1	2,9	3,9	10,7	0,3	31,5	32	9
1:20	1,38	7,2	2	3,5	4,3	10,9	0,2	33,4	31	10
1:20	1,07	6,3	3	3,3	3,3	10,4	0,3	29,7	35	8
1:20	1,30	4,1	3	2,9	3,5	9,6	0,06	28,4	29	7
	<2V/V%	2-10*	<100*	10-40*	7-16*	5-20*	0,1-7,0*	30-70*	<100*	<50*

*Irodalmi adatok (KRÜGER&ANGER 1990)

Az eredményeket összegezve megállapítottam, hogy a korábbi erjesztések eredményei reprodukálhatónak bizonyultak. Amennyiben a beoltáskor 12-20-szor több *Saccharomyces ludwigii* élesztőt alkalmaztam, mint *S. cerevisiae* élesztőt, akkor a főerjesztés során mintegy „kontroll” alatt tartotta a speciális élesztő a sörélesztőt. Ennek megfelelően az alkohol koncentrációja a végtermékben 1,5 V/V% alatt maradt. Az aroma anyagokat illetően az észterek igen alacsony szintje jelenti a legnagyobb hiányosságot, ám a sörélesztő némileg pótolja a *S. codes ludwigii* élesztő fogyatékoságait. A különböző kezdő sejtarányok jelentős eltéréseket nem okoztak az alkohol és aroma anyagok koncentrációja tekintetében, ezért az 1:15 arányt használtam a laboratóriumi sörkészítés során, melyet az 5.4.1.3 fejezetben ismertettek.

5.4.1.2 Módosított szénhidráttartalmú sörlé előállítása laboratóriumi körülmények között

Az erjesztéses vizsgálatok során többször is bebizonyosodott, hogy a *Saccharomyces ludwigii* élesztő (és a többi általam alkalmazott speciális élesztő) számára a sörlé nem tekinthető ideális tápközegnek. Az erjesztés után nagy mennyiségben – közel 50 g/l - marad maltóz (22. ábra) a termékben. Ugyan a maltóz édesítőereje elmarad a szacharózétól, ekkora mennyiségben már befolyásolhatja a termék érzékszervi tulajdonságait édes ízt okozva, ami a sör egyik alapvető ízhibája.

A hagyományos sörlé előállítása során az enzimes keményítőtárolás két lépésben zajlik. A keményítőt a β -amiláz 60-65°C-on erjeszthető szénhidrátokra és β -határdextrinekre, az α -amiláz

pedig 70-72°C-on nem erjeszhető szénhidrátokra bontja. Ha a cefrézés során a 62°C-os hőmérsékleti pihenőt kihagyják és csak az α -amiláz működésére adnak alkalmat 72°C-on, akkor lényegesen kevesebb erjeszhető szénhidrát – glükóz, fruktóz, maltóz, maltotrióz – keletkezik.

A 4.6.1 fejezetben leírt módon végeztem cefrézést pilseni és müncheni, illetve karamell maláták különböző arányú keverékével.

A keverési arányokat az 24. táblázatban ismertetem.

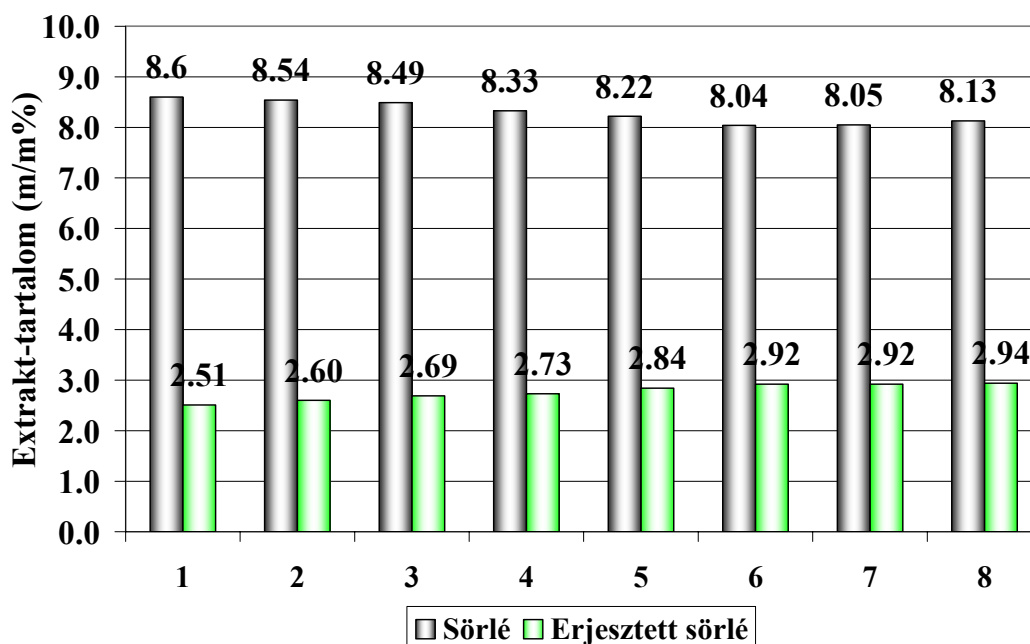
24.táblázat Maláták keverési aránya cefrézési kísérlethez

	1	2	3	4	5	6	7	8
Pilseni maláta	100%	80%	60%	40%	20%	0%	—	—
Müncheni maláta	0%	20%	40%	60%	80%	100%	95%	90%
Karamell maláta	—	—	—	—	—	—	5%	10%

Minden cefrézést kétszer végeztem el. Az első sorozatban a sörleveket *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörlesztővel, a másik sorozatban *Saccharomyces ludwigii* élesztővel oltottam be. Megmértem a sörlevek extrakttartalmát és szénhidrát összetételét. Erjesztés után az előbbieken kívül az alkohol koncentrációt is meghatároztam.

I. cefrézés

Az 36. ábrán és 25. táblázatban az első cefrézési kísérlet során készített sörle valódi maradék extrakttartalmát, majd a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörlesztővel végzett végerjedésvizsgálat eredményeit ismertetem.

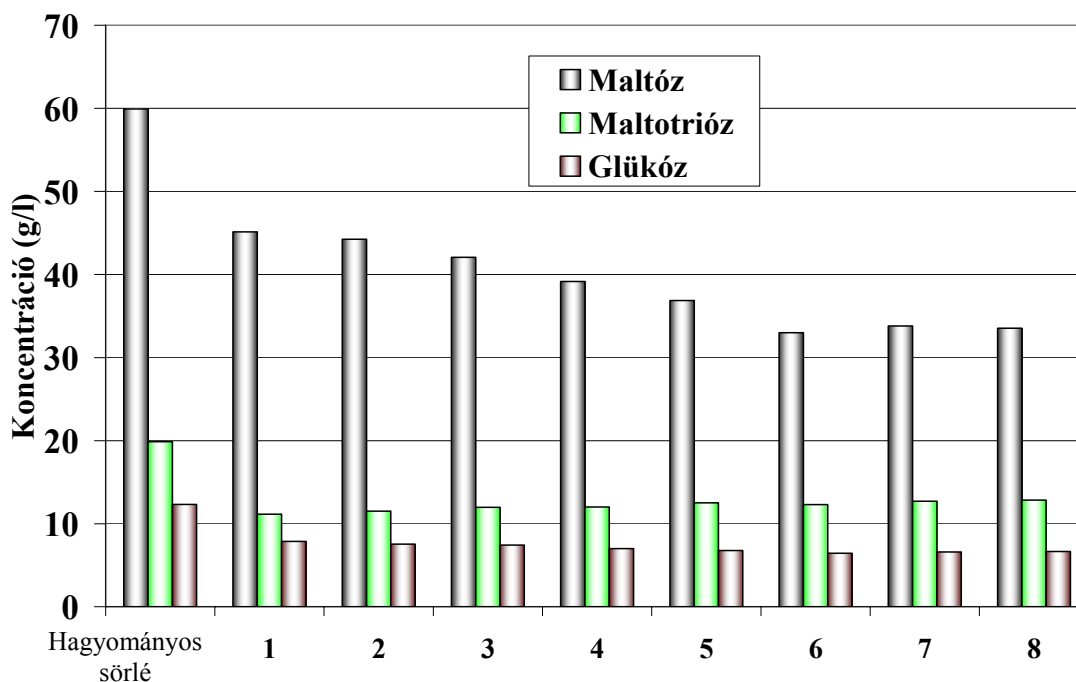


36.ábra. Különböző maláták keverékéből előállított sörlevek és a sörlesztővel erjesztett sörlevek valódi maradék extrakttartalma

25.táblázat Sörélesztővel erjesztett sörlevek végerjedésfoka és alkoholtartalma

	1	2	3	4	5	6	7	8
PILSENI MALÁTA	100%	80%	60%	40%	20%	0%	—	—
MÜNCHENI MALÁTA	0%	20%	40%	60%	80%	100%	95%	90%
KARAMELL MALÁTA	—	—	—	—	—	—	5%	10%
Alkoholtartalom V/V%	4,20	3,89	3,99	3,81	3,71	3,49	3,54	3,57
Végerjedésfok %	89,38	86,54	86,33	84,75	82,91	80,55	80,85	80,95

A hagyományos cefrzési technológiával készülő sörlevek extrakttartalma 12% (m/m) körül szokott lenni. A 100% pilseni maláta felhasználásával előállított sörle esetében mért extrakttartalom tükrözi a módosított cefrzés hatását, a többi minta eredményei pedig a más típusú (kisebb enzimaktivitással rendelkező) maláták alkalmazásának a hatását is. A hagyományos cefrzéssel készült sörle végerjedésfoka 80-88%, ami általában 5 V/V% feletti alkoholtartalmat eredményez. Az általam készült sörlevekre is igaz a 80% feletti végerjedésfok, ám az a müncheni maláta arányának növekedésével fokozatosan csökken. Az alkohol mennyisége viszont alacsonyabb, amire magyarázattal szolgál a sörlevek erjeszthető szénhidrát összetétele, ami a 37. ábrán látható.



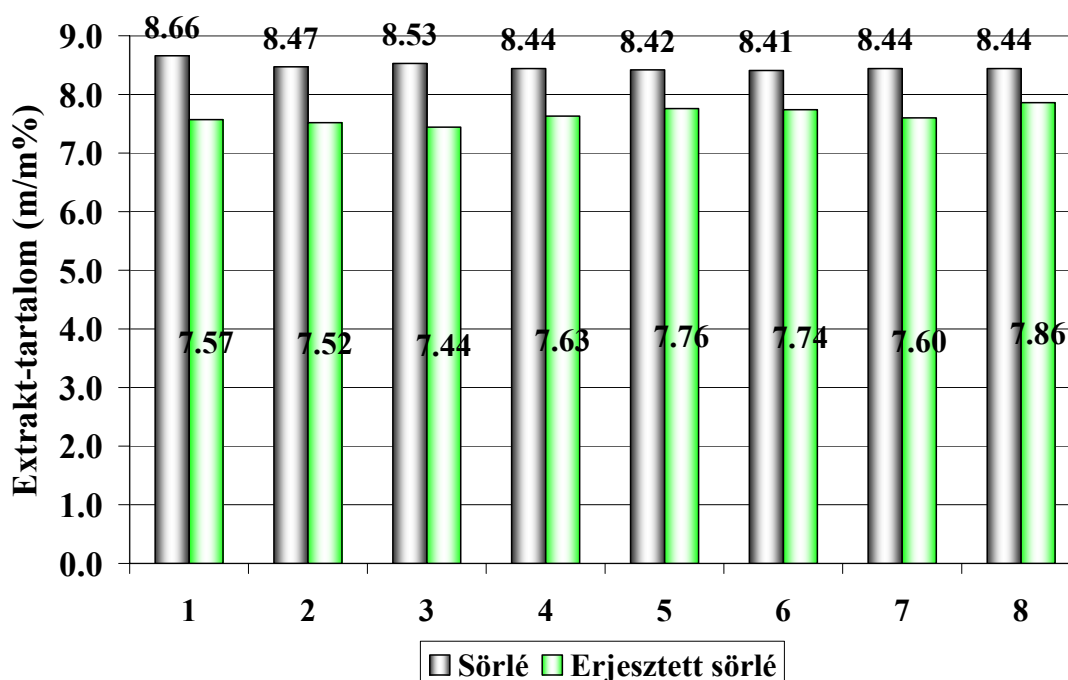
37.ábra. Hagyományos és módosított cefrzéssel készült sörlevek erjeszthető szénhidrátartalma

A cefrzés során a β -amiláz enzim működésének optimális 60-65°C-os hőmérsékleti lépcső kihagyásának eredményeként mindhárom erjeszthető szénhidrát koncentrációja jelentősen csökkent. Számomra pozitív eredmény, hogy a maltóz mennyisége nagymértékben csökkent. Az enzimben gazdag pilseni maláta arányának csökkentése, illetve a kevésbé enzim dús müncheni maláta arányának növelése fokozatosan csökkenti a maltóz koncentrációját a sörleiben.

A *Saccharomyces cerevisiae* WS34/70 sörlesztő ugyan fermentálta a szénhidrátok nagy részét, ám azok abszolút mennyiségének csökkenése a legmagasabb elérhető alkohol koncentrációt is alacsonyabb értéken tartotta (25. táblázat).

II. cefrőzés

Az első cefrőzést megismételtem, ám ez alkalommal a maltózt nem hasznosító *Saccharomyces ludwigii* élesztővel erjesztettem a sörleveket, majd meghatároztam a végerjedésfokot, illetve azt, hogy maximálisan mekkora alkohol koncentráció érhető el.



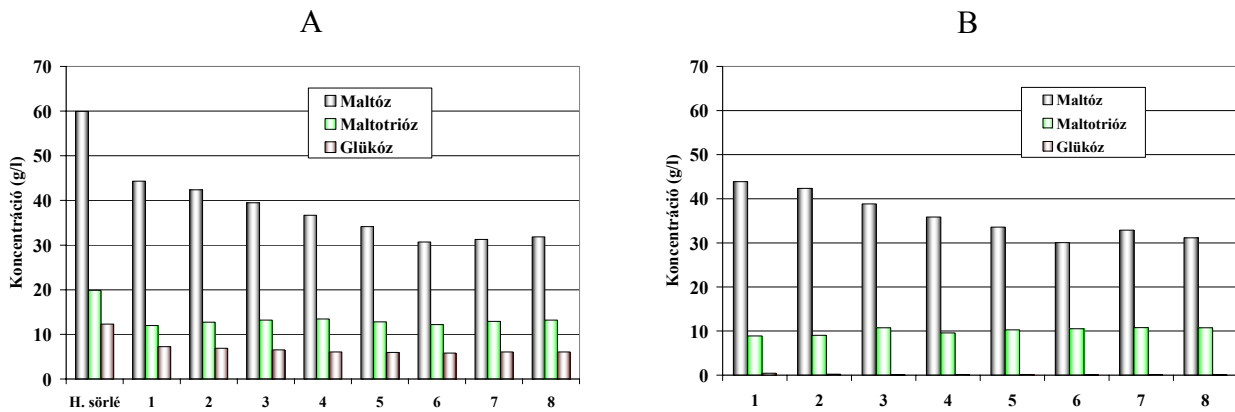
38.ábra. Különböző maláták keverékéből előállított sörlevek és az idegen élesztővel erjesztett sörlevek valódi maradék extrakttartalma

A megismételt cefrőzés hasonló extrakttartalmú sörleveket eredményezett, ám a *Saccharomyces ludwigii* élesztővel végzett erjesztés sokkal kisebb extrakt csökkenést okozott (38. ábra).

26.táblázat *S'codes ludwigii* élesztővel erjesztett sörlevek végerjedésfoka és alkoholtartalma

	1	2	3	4	5	6	7	8
PILSENI MALÁTA	100%	80%	60%	40%	20%	0%	—	—
MÜNCHENI MALÁTA	0%	20%	40%	60%	80%	100%	95%	90%
KARAMELL MALÁTA	—	—	—	—	—	—	5%	10%
Alkoholtartalom V/V%	0,85	0,98	1,34	1,02	0,99	1,05	1,11	1,05
Végerjedésfok %	19,34	21,61	27,18	21,96	21,05	22,00	23,28	21,82

A 26. táblázatban összefoglalt adatok szerint mintegy 75%-kal kisebb végerjedésfokokat mértem és a speciális élesztő által termelt alkohol mennyisége is lényegesen kisebb volt.



39.ábra. Hagymányos és módosított cefrézéssel készült sörlevek (A) majd *S'codes ludwigii* élesztővel erjesztett sör (B) erjeszthető szénhidrát tartalma

Az erjeszthető szénhidrátok mennyiségi aránya jól mutatja a kis alkoholtartalom és végerjedésszint okát. A *Saccharomyces ludwigii* – maltóz negatív – élesztő a glükózt szinte teljes egészében, illetve a maltotrióz 70-75%-át felhasználta, ám a maltózt nem erjesztette (39. ábra).

5.4.1.3 Sör készítése laboratóriumi körülmények között

A *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő és a – korábban ismertetett módon kiválasztott maltózt nem erjesztő speciális élesztő – *Saccharomyces ludwigii* 1:15 arányban kevert kultúrájával, **módosított szénhidrát összetételű sör** erjesztésével kis alkoholtartalmú sört készítettem.

Az alábbi három különböző malátakeverékből álló sörleveget választottam:

- 80% pilseni maláta + 20% müncheni maláta
- 60% pilseni maláta + 40% müncheni maláta
- 95% müncheni maláta + 5% karamell maláta

Ezeket a keverékeket a kedvező végerjedésszint miatt választottam (23. táblázat). Az abszolút értékük alacsony, mert a speciális élesztő a maltózt nem használta fel. Ám lényeges, hogy az élesztő képességeihez mérten a lehető legnagyobb végerjedésszintet érjük el, mert a végtermék tartósságát a maradék szénhidrát tartalom befolyásolja. Természetesen minél kevesebb a maradék cukor, annál kevésbé van kitéve a termék mikrobiológiai romlásnak.

A 4.6.1 fejezetben ismertetett módon készítettem a sörleveget, majd beoltottam a sörélesztő és idegen élesztő keverékével. Az 27. táblázatban a „édes”, majd a komlózott sörlevek és az erjesztés eredményeként kapott termék adatai láthatók.

27.táblázat Módosított cefrézéssel, és *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörlesztő és *Saccharomyces ludwigii* élesztő 1:15 arányú keverékével készült sörök fontosabb paraméterei

	80% PILSENI MALÁTA 20% MÜNCHENI MALÁTA	60% PILSENI MALÁTA 40% MÜNCHENI MALÁTA	95% MÜNCHENI MALÁTA 5% KAREMELL MALÁTA
SÖRLÉ			
EXTRAKTTARTALOM (%)	8,64	8,75	8,99
KOMLÓZOTT SÖRLÉ			
EXTRAKTTARTALOM (%)	9,91	9,81	9,7
MALTÓZ (g/l)	47,9	49,2	41,3
GLÜKÓZ (g/l)	7,40	5,35	11
MALTOTRIÓZ (g/l)	13,7	14,3	17,5
TERMÉK			
EXTRAKTTARTALOM (%)	8,12	8,23	7,56
ALKOHOLTARTALOM (V/V%)	1,03	1,04	0,7
VÉGERJEDÉSFOK (%)	22	20	12
MALTÓZ (g/l)	40,0	40,5	32,6
GLÜKÓZ (g/l)	0	0	5,5
MALTOTRIÓZ (g/l)	12,1	12,3	13,5
ACETALDEHID (mg/l)	11,7	9,8	NA
DMS (µg/l)	4,3	5,2	NA
ÉTIL ACETÁT (mg/l)	2,1	2,9	NA
PROPANOL (mg/l)	3,8	3,8	NA
I-BUTANOL (mg/l)	7,10	7,35	NA
I-AMILACETÁT (mg/l)	0,07	0,06	NA
I-AMILALKOHOL (mg/l)	25,45	24,15	NA
DIACETIL (µg/l)	36,90	36,65	NA
2,3-PENTÁNDION (µg/l)	18,35	17,50	NA

NA: nincs adat

A pilseni és müncheni maláták keverékéből előállított sörlevek és azok erjesztésével készült termékek nagyon hasonlóan bizonyultak mind paramétereiket, mind érzékszervi tulajdonságaikat tekintve.

Az általam felállított követelménynek, hogy alkoholtartalmuk alacsony legyen, mindkettő megfelelt. Aroma anyagait vizsgálva azok kissé elmaradtak az előzetes kísérletben kapottaktól, de ezért az eltérő összetételű sörle lehet a felelős.

A termékek illata kifejezetten aromás volt, ami az ízében is megjelent. Minden bizonnyal a kozmaolajoknak köszönhető a gyümölcsös, kifejezetten mézes illat és íz. A termékben maradt maltóz nem okozott érezhetően édes ízt. A testesség nem volt jellemző egyikre sem, bár ez az alkoholszegény sörökre is elmondható. Összességében kellemes, fogyasztásra mindenképpen alkalmas terméket kaptam.

Szabályos érzékszervi minősítést a minta korlátozott mennyisége miatt nem állt módomban elvégezni.

5.4.2 *Alkoholszegény sör előállítása folyamatos erjesztő rendszerben, rögzített hagyományos és killer sörélesztővel*

Az alkoholmentes és alkoholszegény sörök előállítása rögzített élesztősejtekkel is lehetséges. Az Irodalmi áttekintés 2.5.4 fejezetében részletesen tárgyaltam azokat a fiziológiai változásokat, amiket a rögzítés okoz az élesztősejtekben. Alacsony hőmérséklettel, rövid – néhány órás – érintkeztetési idővel kombinálva a rögzítést, kis alkoholtartalmú termék keletkezik.

Kísérleti munkámban nem csupán egy kis alkoholtartalommal rendelkező termék előállítása volt a cél. Azt is vizsgáltam, hogy az általam létrehozott killer sörélesztő – az alkalmazott körülmények között – képes-e hasonló erjesztési teljesítményre, mint a protoplaszt fúzióban szülőként használt sörélesztő. A genetikai módszerrel létrehozott sörélesztőnek ezen tulajdonsága éppoly fontos, mint a killer aktivitása, melynek vizsgálatát az 5.1.3 fejezetben ismertettem.

Elsőként mindkét élesztőtörzset rögzítettem, majd egy általam összeállított rendszerben vizsgáltam az erjesztési tulajdonságaikat.

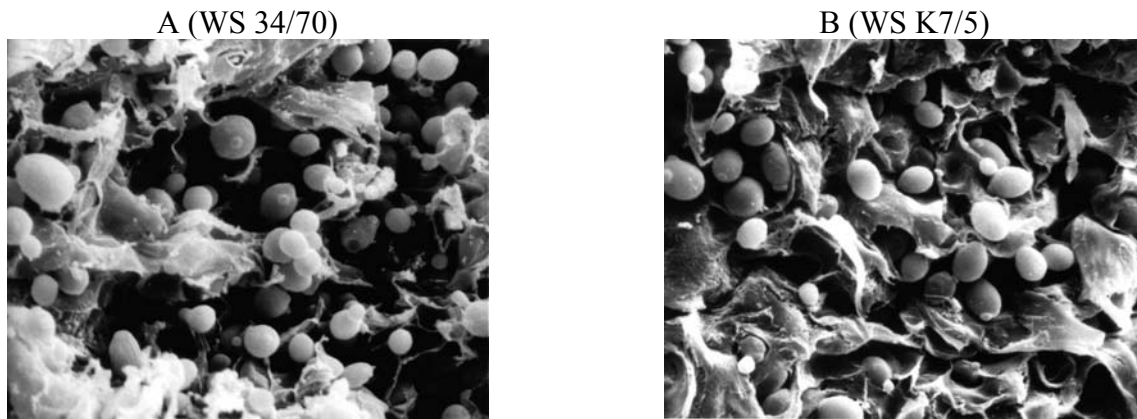
5.4.2.1 *Hagyományos és killer sörélesztő rögzítése*

Az élesztősejtek rögzítéséhez a hagyományos csepegtetési módszert használtam. A sejtek **5-10 x 10⁸ sejt/ml** koncentrációban voltak jelen az így készült alginát gyöngyökben. A nagy sejtszám eléréséhez az élesztősejteket laboratóriumi fermentorban szaporítottam, komplett táptalajban. A katabolit represszió elkerülése érdekében a szénhidrátot (szacharózt) több adagban, meghatározott időközönként adtam a tápleveshez a szaporítás során. A sejteket centrifugálással gyűjtöttem össze, mostam, majd elkészítettem a Na-alginát-élesztő szuszpenziót. Ennél a lépésnél kiemelt fontossága van annak, hogy a szuszpenzió homogén, sima állagú legyen, hiszen a gyöngyök formázásához alkalmazott injekciós tű könnyen eldugul.

Célom az volt, hogy a gyöngyök 1,5-2 mm átmérőjűek legyen. Irodalmi adatok szerint ilyen méretnél még nem lépnek fel anyagátadási problémák, mind a szubsztrátumok, mind a képződő termékek diffúzióval eljutnak a sejtekhez, illetve kijutnak a gélyöngyből. A cél megvalósításához a gyöngyök gyártásakor a következő paramétereket kellett figyelembe venni:

- *Szuszpenzió adagolás:* a perisztaltikus pumpa sebességét az adott szuszpenzióhoz kellett beállítani. Ha túl gyors volt, akkor elnyúlt, csepp alakú gyöngyök váltak le a tűről.
- *A tű átmérője:* 0,6 mm-es bizonyult a megfelelőnek. Nagyobb átmérőjűt használva túl nagy gyöngyöket kaptam.
- *Cseppentési magasság:* a túból kinyomott gyöngyök útjának hossza a CaCl₂ oldatig kb. 20 cm magasságnál bizonyult megfelelőnek. Kisebb magasság esetén csepp alakú gyöngyöket kaptam.

A rögzítéshez a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 hagyományos sörélesztőt (40. ábra), illetve ugyanennek a törzsnek és a K7 killer élesztőnek a protoplaszt fúziójával létrejött killer sörélesztőt (8/a ábra, 5-ös telep) használtam (40. ábra). A továbbiakban a két törzsre „WS 34/70” és „WS K7/5” jelölésekkel fogok utalni.

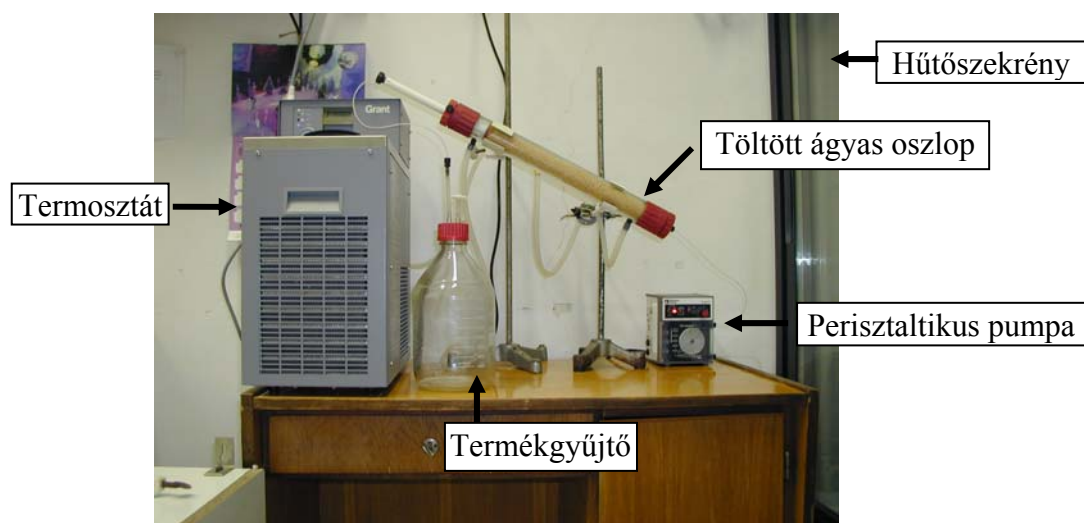


40.ábra. Rögzített hagyományos (A) és killer (B) sörélesztő sejtek pásztázó elektronmikroszkópos képe (1500x-os nagyítás)

5.4.2.2 Folyamatos erjesztés rögzített hagyományos és killer sörélesztővel

A bioreaktor felépítése

Az erjesztések során azt vizsgáltam, hogy a protoplaszt fúzióval létrehozott, killer aktivitást mutató élesztő rendelkezik-e a sörélesztő szülőhöz hasonló fermentációs képességgel. A kísérletekhez egy folyamatos erjesztésre alkalmas termosztálható töltött ágyas bioreaktort állítottam össze, melyet a 41. ábra mutat be.



41.ábra. Rögzített élesztős, töltött ágyas bioreaktor

A sörlevet, amelyet a bioreaktorban erjesztettem, hűtőben tároltam (a kép jobb szélén látható).

A folyamatos fermentor beállítása

A tényleges vizsgálatok megkezdése előtt be kellett állítani a folyamatos fermentort. Ehhez előzetes erjesztéseket hajtottam végre, megfigyelve a berendezés működését.

Hőmérséklet: a próba erjesztés 4°C-on történt, ami túl magas hőmérsékletnek bizonyult. Az oszlopról lejövő termék etanol tartalma meghaladta az 1-1,5 V/V%-os kitűzött értéket. A továbbiakban az erjesztéseket 2°C-on végeztem.

A sörle betáplálása: a próba erjesztés során az oszlop tetején lépett be a sörle és alul lépett ki. A kilépő termékben $2-4 \times 10^6$ sejt/ml koncentrációban volt jelen élesztő, ami túl magas érték, nagyárnyú volt a kimosódás. A sörle irányát megfordítottam: a betáplálás alul, a kilépés felül történt, ami megoldotta a problémát, minimális mennyiségű élesztősejt volt jelen a termékben.

A sörle sterilizálása: a próba erjesztések során azt tapasztaltam, hogy az oszlop befertőződött, ha nem sterilizált sörlevet használtam. Ezért a továbbiakban csak sterilizált sörlevet engedtem az oszlopra, valamint hűtve tároltam azt erjesztés közben is.

Az oszlop elhelyezkedése. Az első használathoz az oszlopot függőleges pozícióban rögzítettem. Az erjesztés során azonban jelentős mennyiségű szén-dioxid képződött, ami nem tudott szabadon távozni és az alginát gyöngyöket az oszlop felső részébe nyomta. Ez dugulást eredményezett. Az oszlopot ezután az 12. ábrán is látható megközelítőleg 45°-os szögben rögzítettem, így a CO₂ úgy tudott eltávozni az oszlopból, hogy nem okozott dugulást.

Mintagyűjtés és -elemzés folyamatos erjesztések során

Az erjesztések során a mintagyűjtő üvegben összegyűlt terméket meghatározott időközönként megvizsgáltam, és a legfontosabb paramétereket regisztráltam. A *mintamennyiségét* lemértem, majd az eltelt idő alapján ebből számítottam a *tényleges térfogatáramot*. Ezt követően a mintát centrifugáltam (5000 rpm, 10 min) vagy redős szűrőn kovaföldön leszűrtem, és szén-dioxid mentesítést végeztem. A tükrösre szűrt mintákat többféle analízisnek vettem alá:

- A sörökre jellemző legfontosabb paramétereket (lásd 4.7.3 fejezet) söranalizátoron mértem.
- HPLC-n meghatároztam az erjeszhető szénhidrátok fogyását (lásd 4.7.2 fejezet).
- A sörökre jellemző aroma anyagok koncentrációját gázkromatográffal mértem (lásd 4.7.1 fejezet).

Az így kapott adatokat összehasonlítva arra kerestem választ, hogy a protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörélesztő erjesztési tulajdonságai hasonlítanak-e ahhoz a hagyományos sörélesztőhöz, amiből létrehoztam. Az élesztő egyik „feladata” a sörle fermentálása során, hogy a rendelkezésére álló erjeszhető szénhidrátokból alkoholt állítson elő. Úgy gondoltam, hogy a két élesztő teljesítményének összehasonlítására az etanol termelés alkalmas lesz.

Erjesztési tulajdonságok

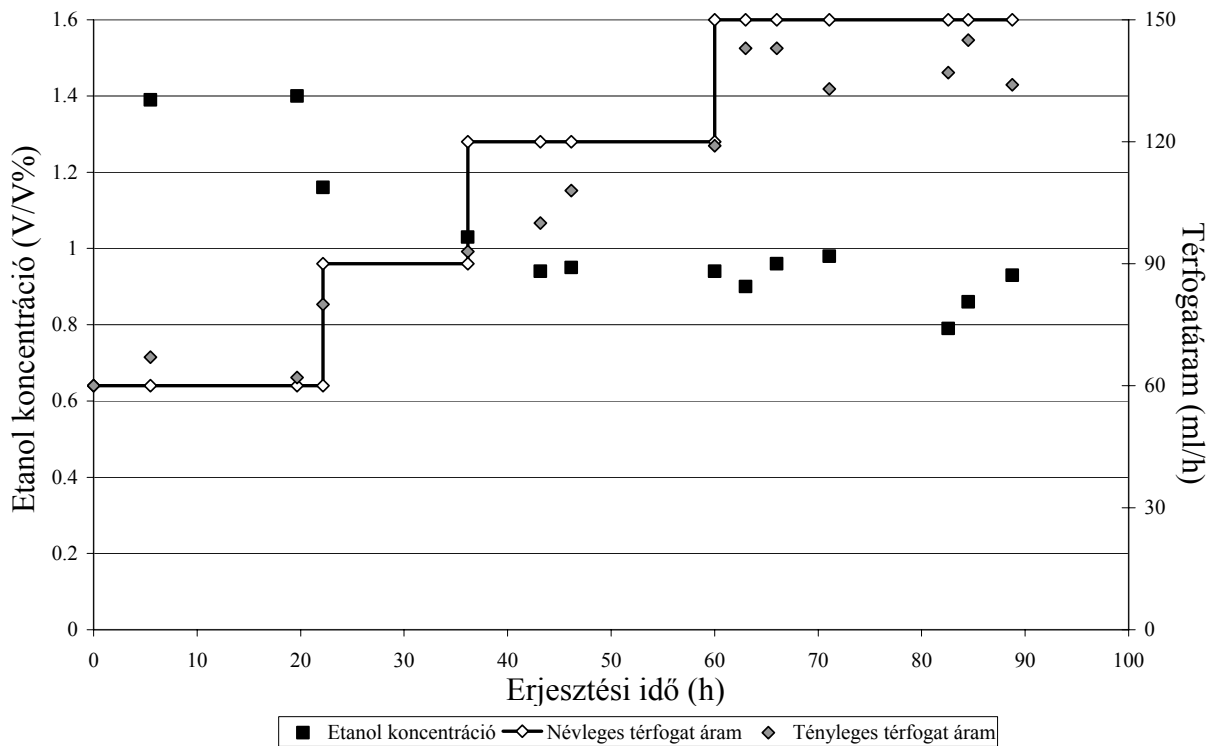
Folyamatos erjesztési rendszerek esetében az egyik legfontosabb paraméter a térfogatáram, illetve az ebből következő tartózkodási idő. A tartózkodási idő pedig befolyásolja, hogy a sejteknek mennyi kontaktidő áll rendelkezésükre a szénhidrátok felhasználására és fermentálására. Ha az erjesztés alatt változtatom a térfogatáramot, az hatással lesz a képződő etanol mennyiségére.

Az erjesztések során 4 különböző térfogatáramot állítottam be, ami – 150 ml töltetet használva – az alábbi tartózkodási időknek felelt meg (27. táblázat):

27.táblázat Névleges térfogatáramok és annak megfelelő tartózkodási idők

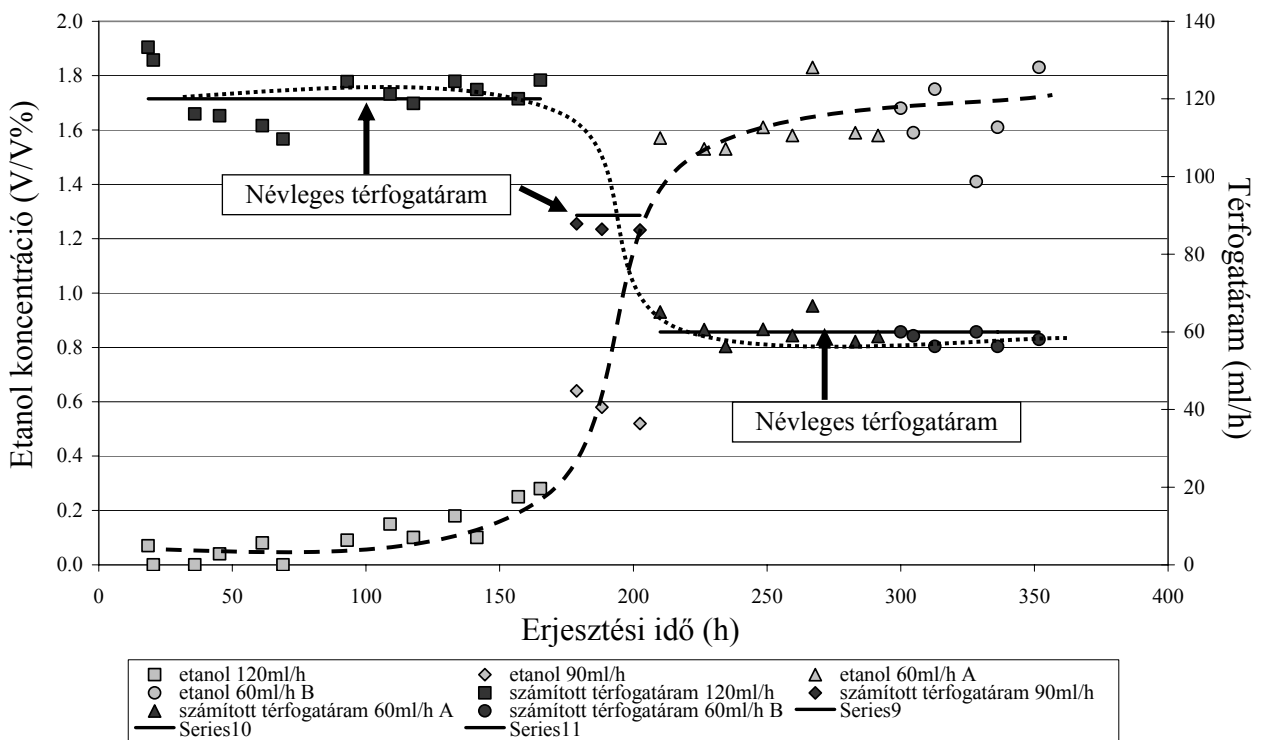
TÉRFOGATÁRAM	TARTÓZKODÁSI IDŐ
60 ml/h	2,5 h
90 ml/h	1,66 h
120 ml/h	1,25 h
150 ml/h	1 h

Diagramon ábrázoltam a tervezett és számított térfogatáramot, illetve a képződött etanol mennyiségét az erjesztési idő függvényében. Az 42. ábrán a WS 34/70-es hagyományos sörélesztő, az 43. ábrán pedig a WS K7/5-ös killer sörélesztő fermentációja során mért adatok láthatók. Az ábra bemutatja, hogy a két élesztőtörzs egyformán viselkedett az erjesztések során: a térfogatáram csökkentésével a termelt etanol mennyisége növekedett. Sőt, ha nem csak a tendenciát veszem figyelembe – amit a WS K7/5 élesztő esetében az ábrán szaggatott vonallal is jelöltem – hanem a számszerű adatokat is, akkor megállapítható, hogy a legalacsonyabb térfogatáramnál (60 ml/h) a killer sörélesztő jobban teljesített. Míg hagyományos sörélesztő 1,4 V/V% körüli értéket ért el, addig a killer sörélesztő 1,4 és 1,8 V/V% közötti mennyiségben termelt alkoholt.



42.ábra. Folyamatos erjesztés *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 élesztővel

A térfogatáram növelésével az etanol koncentráció mindkét élesztő esetében csökkent. Megfigyelhető, hogy a killer sörélesztő 120 ml/h térfogatáram beállításakor már alig állított elő alkoholt, az értékek 0 és 0,4 V/V% között változtak. A hagyományos sörélesztő 120-150 ml/h névleges térfogatáramnál is 0,8-1 V/V% koncentrációban termelt etanolt.

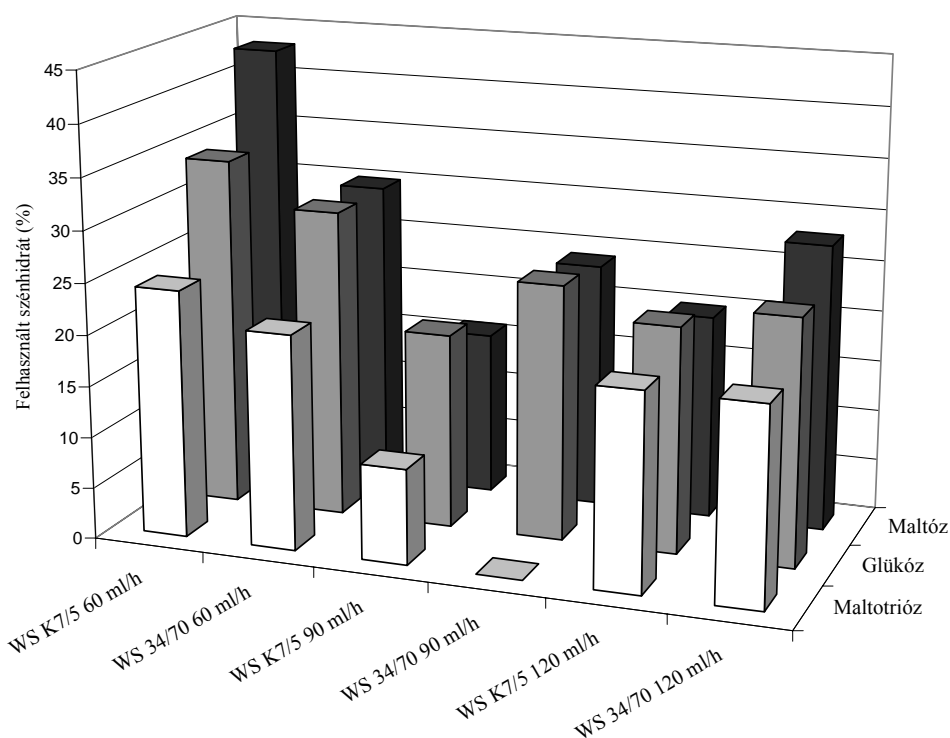


43.ábra. Folyamatos erjesztés WS K7/5 killer sörélesztővel

Szénhidrát hasznosítás

A jelenség okát jól mutatja a szénhidrát analízis eredménye. Megmértem a sörlében található glükóz, maltóz és maltotrióz mennyiségét, majd 3 különböző térfogatárammal (60, 90, 120 ml/h) végzett folyamatos erjesztés után a termékben maradt szénhidrátokat. Az 44. ábrán azt ábrázoltam, hogy a két élesztőtörzs a rendelkezésre álló szénhidrátok hány százalékát használta fel. Az adatok szerint 60 ml/h térfogatáramnál a killer sörélesztő nagyobb százalékban hasznosította mindhárom szénhidrátot, amiből egyenesen következik a nagyobb etanol koncentráció. A 90 és 120 ml/h-es térfogatáram alkalmazásakor azonban maltózból és glükózból a hagyományos sörélesztő erjeszt nagyobb mennyiséget, ami meg is jelenik a képződött alkohol mennyiségekben.

Ezek alapján megállapítottam, hogy nagyobb térfogatáram esetén a hagyományos sörélesztő hatékonyabban tudja felvenni a sörlében található erjeszthető szénhidrátokat (44. ábra).



44.ábra. A rögzített sörélesztő és killer sörélesztő szénhidrát hasznosítása különböző térfogatáramoknál

Aromatermelés

A sörök esetében az aroma anyagok mennyisége meghatározó tényező. A folyamatos erjesztéskor gyűjtött mintákat gázkromatográfias vizsgálatoknak is alávettem, hogy a bennük jelen lévő, érzékszervileg aktív vegyületek mennyiségét meghatározzam. Az értékelést annak figyelembe vételével végeztem el, hogy az általam vizsgált minták csak fickósörnek tekinthetők, mivel ászokolásuk nem történt meg.

28.táblázat Hagyományos és killer sörélesztő által erjesztett minták illékony aroma komponenseinek mennyisége

TÉRFOGATÁRAM ml/h	ÉLESZTŐTÖRZS	ACETALDEHID mg/l	DMS µg/l	ETIL-ACETÁT mg/l	PROPANOL mg/l	I-BUTANOL mg/l	I-AMILALKOHOL mg/l	DIACETIL µg/l	2,3-PENTÁNDION µg/l
120	WS 34/70	15,1	15,0	0,9	1,5	0,8	3,4	200	90
	WS K7/5	4,3	31,3	0,4	0,9	0,4	3,9	67	22
90	WS 34/70	3,7	26,0	0,6	1,2	0,6	4,0	242	98
	WS K7/5	9,2	47,2	0,5	3,4	0,8	4,5	107	41
60	WS 34/70	3,9	23,0	1,0	1,6	0,8	4,7	248	88
	WS K7/5	12,0	28,0	0,7	4,0	0,9	6,0	119	47
Irodalmi adatok (KRÜGER&ANGER 1990)		2-10	<100	10-40	7-16	5-20	30-70	<100	<50

DMS: dimetil-szulfid

A gázkromatográfias mérések alapján a killer sörélesztő az adott körülmények között nagyon hasonló teljesítményt nyújtott, mint a hagyományos sörélesztő. Néhány esetben a killer sörélesztő által erjesztett minták jobb eredményeket adtak (ezeket kiemeltem az 28. táblázatban). Látható, hogy a killer sörélesztő észter szintézise némileg elmarad a hagyományos sörélesztőjétől, ám a kozmaolajok (propanol, izo-butanol, izo-amilalkohol) mennyisége kedvezőbb, különösen a kisebb térfogatáram alkalmazásánál. Külön kiemelném a diacetil koncentrációra kapott adatokat, amelyek arra utalnak, hogy a killer sörélesztő kevesebbet termel ebből a sör minőségét károsan befolyásoló vegyületből. A hagyományos sörélesztő mintáiból mért 200-250 µg/l-es értékek is megfelelnek az ipari gyakorlatban tapasztalt mennyiségnek (MISINSZKI 2000). A sörélesztő képes redukálni az általa szintetizált diacetilt, de kétségtelenül előnyös, ha a szintetizált mennyiség eleve alacsony. A diacetilt indikátor vegyületnek tekintik: amikor mennyisége 100 µg/l alá csökken, az ászokolás befejeződött, a sör kereskedelemben kiadható. A táblázat utolsó sorában a kész sörben elvárt aromaanyag mennyiségeket tüntettem fel (KRÜGER&ANGER 1990). Ezekről, természetesen az általam mért értékek jelentősen elmaradnak a folyamatos erjesztésből adódó rövid kontaktidő, az ászokolás hiánya és az alacsony erjesztési hőmérséklet miatt (2°C) is.

A munkám során használt hagyományos sörélesztő, a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 iparban is széles körben alkalmazott törzs, melynek erjesztési tulajdonságai és aroma termelése is kiváló. A WS 34/70 és egy killer élesztő törzs (K7) protoplaszt fúziójával létrehozott élesztőtörzs (WS K7/5) a molekuláris vizsgálatok szerint genetikai állományát tekintve nagyon hasonlóan bizonyult a sörélesztő szülői törzshöz, és kétségkívül rendelkezik killer aktivitással. A rögzített sejtekkel elvégzett folyamatos fermentációk során kapott adatok is azt bizonyítják, hogy a vizsgált körülmények között a killer sörélesztő a hagyományos sörélesztőhöz nagyon hasonló képességekkel rendelkezik.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A sör piacának visszaszorulása miatt a csúcstechnológiával felszerelt üzemek kapacitásuk egy részét nem tudják kihasználni. Ez talán jelzésként szolgálhatna a gyártóknak, hogy érdemes újszerű termék(ek) fejlesztésében gondolkodni, egyrészt kapacitásuk kihasználása, másrészt a fogyasztók új csoportjának meghódítása érdekében. A termékfejlesztést – mint minden kutatást – alapkutatás kell, hogy megelőzze.

1. Killer sörélesztő létrehozása protoplaszt fúzióval és vizsgálata

A jó sör előállítása nagyban függ az erjesztés minőségétől. Maga a folyamat a fermentációs körülmények és az alkalmazott sörélesztő törzs tökéletes kombinációja kell, hogy legyen. Akár a körülményekben, akár az élesztőben bekövetkező legkisebb változás is élvezhetetlen terméket eredményezhet. Emiatt a sörgyártók igen vonakodva fogadják, ha bármilyen módon módosítják az élesztősejtet. A bor erjesztésében résztvevő élesztők között természetes jelenség a killer aktivitás, a sütőiparban pedig sikerrel alkalmaznak olyan – genetikai manipulációval létrehozott – élesztőket, amelyek killer toxin termelő képességük révén „védik” a saját tevékenységüket.

Kísérleti munkám során protoplaszt fúzióval létrehoztam egy killer aktivitással rendelkező sörélesztőt. Ehhez többlépéses szelekcióval a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 törzset választottam sörélesztő szülőnek, mely világszerte alkalmazott élesztőtörzs a söriparban, kiváló az erjesztési képessége és az aroma termelése. A rendelkezésemre álló killer élesztő törzsek közül a K1 típusú *Saccharomyces cerevisiae* K7 jelű bizonyult megfelelőnek. A fúziós termékek genetikai tulajdonságait kariotipizálással és dsRNS plazmid izolálással vizsgáltam.

Ezt követően a sörélesztő killer aktivitását több szempontból is tanulmányoztam. Az elvégzett kísérletek azt igazolták számomra, hogy egy protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörélesztő akkor is képes hatékonyan toxint termelni az erjesztés során, és érzékeny (vad)élesztőket elpusztítani, ha relatíve kis mennyiségben van jelen a káros élesztőhöz viszonyítva. A vizsgálatok szerint a killer élesztő erre az optimális 23°C alatt is képes, noha csökkent aktivitással. Végezetül pedig a vizsgálatok azt mutatták, hogy a toxint kódoló plazmid tartósan megmaradt az élesztőtörzsben.

2. Kevert kultúras erjesztések sörélesztőkkel és idegen élesztőkkel

Sörgyártói körökben eretnek gondolatnak számít a hagyományos sörélesztőn kívül más élesztőtörzset is alkalmazni az erjesztés során. Az viszont ismeretes, hogy az alkoholmentes vagy alkoholszegény sörök előállításának egyik lehetséges módja olyan speciális élesztők alkalmazása, amely szénhidrát hasznosítása eltér a sörélesztőtétől. Az ún. maltóz negatív élesztők nem hasznosítják a sörlében legnagyobb mennyiségben jelenlévő erjeszthető cukrot, a maltózt, így csekély koncentrációban termelnek alkoholt. Ezen törzsek felhasználásával kapcsolatban nagyon

kevés adat áll rendelkezésre a szakirodalomban. A söre nem jellemző, hogy erjesztésében több mikroorganizmus venne részt, kivételt a belga lambic (gueze) sörök és a német Weissbier képviselnek.

Az elvégzett kísérlet sorozattal az volt a célom, hogy a rendelkezésemre álló speciális élesztők közül – amelyek nem erjesztenek maltózt – kiválasszam azt (vagy azokat), amelyet a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő törzssel kevert kultúrában alkalmazva alkoholszegény (< 2V/V%) terméket eredményez. Feltétel volt, hogy a termék aromái a hagyományos sör aromáival összevethetők legyenek.

Ezen kritériumoknak a *Saccharomyces ludwigii* élesztő felelt meg. Úgy találtam, hogy ha a kezdeti *S. cerevisiae* - *Saccharomyces ludwigii* arány 1:10 és 1:20 között van, akkor az utóerjesztést követően egy alkoholszegény és megfelelő aroma összetételű terméket kapok. A keverési arány pontosítása érdekében újabb erjesztési kísérletet végeztem, és az 1:15 arányt találtam megfelelőnek.

3. Élesztőtörzsek közötti kölcsönhatások vizsgálata

A *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő és a *Saccharomyces ludwigii* élesztő kölcsönhatását vizsgáltam munkám harmadik részében. Az előzőekben ismertetett kevert kultúras erjesztések során – melyeket sörlében végeztem – azt tapasztaltam, hogy ha a sörélesztő - nem-*Saccharomyces* élesztő kezdeti sejtszáma 1:10 vagy ennél nagyobb volt, akkor a *S. cerevisiae* sörélesztőt túlnötte a nem-*Saccharomyces* élesztő. A jelenség azért volt érdekes számomra, mert a sörélesztőnek ideális tápközeg a sörlé, míg a maltózt nem hasznosító *S. codes ludwigii* élesztőnek nem.

Kölcsönhatásukat vizsgálva először az idegen élesztő killer aktivitását térképeztem fel. Killer toxin – ha kis mennyiségben van jelen – esetleg okozhatja a szaporodás gátlását. A metilénkékes táptalajon agar diffúzióval elvégzett vizsgálatok azonban nem utaltak killer aktivitásra a *S. cerevisiae* WS 34/70 sörélesztővel szemben ezért ezt a feltételezést elvettem.

Továbbiakban kevert kultúras erjesztéseket végeztem 8 és 20°C-on, különböző kezdő sörélesztő-idegen élesztő sejtarányokkal (1:1, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, ill. 10:1), nyomon követtem a sejtszámok alakulását és a szénhidrátok felhasználását. Kétféle módszert alkalmaztam: az egyik azt mutatja ki, ha a nem-*Saccharomyces* élesztő olyan jellegű vegyületet termel, ami lassítja a sörélesztő szaporodását, míg a másik módszer a sejt-sejt kontaktus szaporodást szabályozó szerepét vizsgálja.

Feltételezésem szerint a jelenségnek két magyarázata lehet.

(1) A nem-*Saccharomyces* élesztő olyan vegyületet termel, ami lassítja a sörélesztő növekedését. A közepes szénláncú zsírsavak közül a kaprilsav (oktánsav) és kaprinsav (dekánsav), valamint az ecetsav gátló hatását a *Saccharomyces* élesztőkre BISSON (1999), VIEGAS és munkatársai (1989),

valamint LUDOVICO és munkatársai (2001) is kihangsúlyozták, megjegyezve azt is, hogy a nem-*Saccharomyces* élesztők szintetizálnak ilyen vegyületeket.

(2) A nem-*Saccharomyces* nagyobb tápanyag szükséglete révén (NISSEN et al 2003) kimeríti a tápközegnek egy olyan komponensét, ami a sörélesztő normális szénhidrát-felvételéhez, anyagcseréjéhez szükséges, aminek hiányában szaporodása lassul. Ez esetben a továbbiakban behatóan kell tanulmányozni (1) a sörélesztő szénhidrát-anyagcseréjét, elsősorban a maltóz és maltotrióz felvételét befolyásoló tényezőket, valamint (2) a tápközeg nitrogén- és vitamintartalmának változását.

A nitrogén hiány az egyik, amit mint erjedést és élesztő szaporodást gátló tényező említenek. A sörélesztőknél nitrogén hiány esetén a tápközegben lévő glükóz indukál egy folyamatot, ami a maltóz transzporterek inaktiválását eredményezi. Ebben az esetben nem csak hogy akadályoztatva van az új maltóz transzporterek szintézise, hanem a már létező transzporterek is eltűnnek (RAUTIO&LONDESBOROUGH 2000).

BISSON (1999) összefoglaló cikkében leírta, hogy a kevert kultúras fermentációk vitamin szükséglete a szokásosnál nagyobb. A vitaminok nagyobb fogyasztást eredményezi, ha alacsony hőmérsékleten végeznek *Saccharomyces* és nem-*Saccharomyces* élesztők keverékével erjesztést. Az alacsonyabb hőmérséklet a nem-*Saccharomyces* élesztőknek kedvez, és ez szintén a vitaminok gyors fogyáshoz vezet, lelassítva ezzel a *Saccharomyces* élesztő további fermentációs tevékenységét.

4. Biotechnológiai módszerek alkalmazása alkoholszegény sörök előállítására

Napjainkban az alkoholmentes és alkoholszegény sörök gyártásának technológiája általában két módszerrel történik. Egyfelől a normál erjesztési technológiával előállított sörből evaporációval, dialízissel vagy reverz ozmózissal távolítják el az alkoholt (KUNZE 1999, PILIPOVIK&RIVEROL 2005). Másfelől ún. megszakított erjesztést végeznek, amikor vagy nagyon rövid érintkeztetési idő (0,5-8 óra) és magas hőmérsékletet (15-20°C), vagy kicsit hosszabb érintkeztetési időt (24 óra) és alacsony hőmérsékletet (0-5°C) alkalmaznak (VAN IERSEL et al. 1998).

A speciális élesztők alkalmazását, melyek a sörélesztőtől eltérő szénhidrát hasznosításuk révén (elsősorban a maltózt nem erjesztik) termelnek kisebb mennyiségben alkoholt, említik a szakirodalomban (KUNZE 1999), ám gyakorlati alkalmazásáról üzemi méretekben nincs tudomásom.

A korábbi eredményeket összegezve megállapítottam, hogy amennyiben a beoltáskor 12-20-szor több *Saccharomyces ludwigii* élesztőt alkalmaztam, mint *S. cerevisiae* élesztőt, akkor az alkohol koncentrációja a végtermékben 1,5 V/V% alatt maradt. Az aroma anyagokat illetően az észterek igen alacsony szintje jelenti a legnagyobb hiányosságot, ám a sörélesztő némileg pótolja a speciális élesztő fogyatékoságait.

Módosított szénhidrát tartalmú sörlé előállítása laboratóriumi körülmények között

Az erjesztés vizsgálatok során többször is bebizonyosodott, hogy a *Saccharomyces ludwigii* élesztő számára a sörlé nem tekinthető ideális tápközegnek. Az erjesztés után nagy mennyiségben – közel 50 g/l - marad maltóz a termékben. Ugyan a maltóz édesítőereje elmarad a szacharózétól, ekkora mennyiségben már befolyásolhatja a termék érzékszervi tulajdonságait édes ízt okozva, ami a sör egyik alapvető ízhibája lehet. A hagyományos technológiától eltérve úgy állítottam elő lényegesen kevesebb erjeszhető szénhidrátot – glükózt, fruktózt, maltózt, maltotriózt – tartalmazó sörlevet, hogy (1) a megszokott pilseni maláta mellett müncheni és karamell malátát is használtam, valamint (2) a cefrézés során – elhagyva a β -amiláz működéséhez optimális 62°C-os hőmérsékleti pihenőt – csak az α -amiláz működéséhez megfelelő 72°C-on tartottam hőmérsékleti pihenőt a keményítő bontásához. Az így kapott sörlevek erjeszhető szénhidrát tartalma 25-50%-kal kevesebb lett, mint a hagyományos sörlé cukor tartalma.

Sör készítése laboratóriumi körülmények között

A *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő és a – korábban ismertetett módon kiválasztott maltózt nem erjesztő speciális élesztő – *Saccharomyces ludwigii* 1:15 arányban kevert kultúrájával, **módosított szénhidrát összetételű sörlé** erjesztésével alacsony alkoholtartalmú sört készítettem (< 2 V/V%).

A termékek illata kifejezetten aromás volt, ami az ízében is megjelent. Minden bizonnyal a kozmaolajoknak köszönhető a gyümölcsös, kifejezetten mézes illat és íz. A termékben maradt maltóz nem okozott érezhetően édes ízt. A testesség nem volt jellemző egyikre sem, bár ez az alkoholszegény sörökre általában is elmondható. Összességében kellemes, fogyasztásra mindenképpen alkalmas terméket kaptam. A továbbiakban félüzemi méretben is tervezem a termék előállítását.

Alkoholszegény sör előállítása folyamatos erjesztő rendszerben, rögzített hagyományos és killer sörélesztővel

Az alkoholmentes és alkoholszegény sörök előállítása rögzített élesztősejtekkel is lehetséges. Az Irodalmi áttekintés 2.5.4 fejezetében részletesen tárgyaltam azokat a fiziológiai változásokat, amiket a rögzítés okoz az élesztősejtekben. Alacsony hőmérséklettel, rövid – néhány órás – érintkezési idővel kombinálva a rögzítést, kis alkoholtartalmú termék keletkezik.

Kísérleti munkámban nem csupán egy kis alkoholtartalommal rendelkező termék előállítása volt a cél. Azt is vizsgáltam, hogy az általam protoplaszt fúzióval létrehozott killer sörélesztő – az alkalmazott körülmények között – képes-e hasonló erjesztési teljesítményre, mint a protoplaszt fúzióban szülőként használt sörélesztő. Ezt rögzített sejtes, folyamatos rendszerben végzett erjesztéssel vizsgáltam.

Mind a *S. cerevisiae* WS 34/70 szülői sejteket, mind a killer sörélesztőt Ca-alginát gyöngybe gélbezárással rögzítettem, majd folyamatos rendszerben erjesztéseket végeztem. A sörlevet 60-150 ml/h sebességgel áramoltatva át az oszlopon vizsgáltam a szénhidrát felhasználást, az alkohol- és aromatermelést.

A *S. cerevisiae* WS 34/70 és egy killer élesztő törzs (K7) protoplaszt fúziójával létrehozott élesztőtörzs a molekuláris vizsgálatok szerint genetikai állományát tekintve nagyon hasonlónak bizonyult a sörélesztő szülői törzshöz, és kétségtelenül rendelkezik killer aktivitással. A rögzített sejtekkel elvégzett folyamatos fermentációk során kapott adatok is azt bizonyítják, hogy a vizsgált körülmények között a killer sörélesztő a hagyományos sörélesztőhöz nagyban hasonló képességekkel rendelkezik.

Ezzel a módszerrel, hasonlóan a kétféle élesztővel indított kevert kultúras erjesztéshez, 2 V/V% alatti alkoholtartalmú terméket kaptam, bár – az utóerjesztés elmaradása miatt – aroma anyagokban szegényebb volt a termék.

7 SUMMARY

Due to the shrinking of the beer market production capacity of high-tech breweries are not fully exploited. This should be a “sign” for brewers that development of novel products could help to (1) use more of their capacity and (2) win over new groups of consumers. Product development should be preceded by basic research.

1. Construction of a killer brewer’s yeast by protoplast fusion and its examination

Production of good beer depends on the quality of the fermentation to a great extent. The process itself should be the faultless combination of fermentation conditions and the applied brewer’s yeast strain. Even the slightest change in the conditions or the yeast may result a product of reduced quality. For this reason beer producers are reluctant to accept any kind of change regarding the brewer’s yeast.

In my research work I constructed a brewer’s yeast possessing killer activity by protoplast fusion. In a multi-step selection I had chosen the world-wide applied *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 yeast strain as brewer’s yeast parent, which is well-known of its excellent fermentation and aroma producing ability. Of the killer yeast strains that were available the *Saccharomyces cerevisiae* K7, a K1 killer type strain proved to be adequate. Genetic properties of the fusion products were investigated with kariotyping and dsRNA plasmid isolation.

In the followings I studied the killer activity of the constructed killer brewer’s yeast. Examinations proved that the killer brewer’s yeast is effectively during fermentation. It is capable of producing sufficient amount of the toxin, and destroys sensitive yeast cells; even when present in a relatively small concentration compared to the sensitive yeast. According to the tests, the killer brewer’s yeast is capable of that at temperatures below the optimal 23°C, although with reduced activity. Finally, control examinations have shown that the plasmid responsible for encoding the toxin remained stable in the yeast strain after several years.

2. Mixed-culture fermentations with brewer’s yeast and non-brewer’s yeast

In the world of brewing one might consider it as a heretical thought to deliberately apply non-brewer’s yeast for the production of beer, in spite of the fact that one of the solutions to produce non-alcoholic or low-alcoholic beer is the use of special yeast having altered carbohydrate metabolism. The so-called maltose-negative yeast strains are incapable to ferment maltose, which is present in the largest concentration among fermentable carbohydrates in the wort. Due to this, special yeast strains produce small amount of alcohol. Information is scarce on the application of such yeast in the literature. It is not typical of beer that more than one microorganisms participates in the fermentation, except for Belgian lambic (gueze) beer and German weissbier.

My goal with the performed test series was to select one from the available maltose-negative yeast strains, which is suitable to use in mixed-culture fermentation with the *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 brewer's yeast to make a product with less than 2 percent (v/v) alcohol content. Further condition was that the resulted product should have similar aroma profile as beer.

The yeast *Saccharomyces ludwigii* met the requirements. I found that an initial brewer's yeast - non-brewer's yeast cell ratio of 1:10 to 1:20 is suitable to obtain low-alcoholic product with the desired aroma profile.

3. Investigation of interaction between yeast strains

In the third part of my work I have investigated the interaction of *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 brewer's yeast and *Saccharomyces ludwigii* yeast. During the previously outlined mixed-culture fermentations (all performed in all-malt wort) I experienced that if the fermentation is initiated with 1:10 to 1:20 brewer's yeast - non-brewer's yeast cell ratio, then by the end of the process the *S'codes ludwigii* cells were present in higher number than the *S. cerevisiae*. This phenomenon is interesting because all-malt wort is an ideal medium for the brewer's yeast, while for the maltose-negative *S'codes ludwigii* yeast not.

First I investigated the possibility of killer activity by *S'codes ludwigii* yeast. I performed agar well diffusion assay on medium containing methylene blue, but the results did not indicate that the non-brewer's yeast would produce any toxin.

Next I performed mixed-culture fermentations at 8 and 20°C with different initial brewer's yeast - non-brewer's yeast cell ratios (1:1, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30 and 10:1), followed the process by determining the cell concentrations and carbohydrate utilization. I used two methods: one reveals whether the non-brewer's yeast synthesises any compound that might slow the growth of brewer's yeast, while the other examines the possible growth controlling effect role of cell-cell contact.

According to my assumption the phenomenon has two explanations.

(1) The *S'codes ludwigii* yeast synthesises such compound that slows down the growth of brewer's yeast. Of the medium chain fatty acids, caprylic acid (octanoic acid) and capric acid (decanoic acid), and also acetic acid are known of their inhibitive effect on *Saccharomyces* yeasts. It is also well-known that non-*Saccharomyces* yeasts do synthesis these compounds. (BISSON 1999, VIEGAS et al. 1989, LUDOVICO et al. 2001)

(2) Due to the greater nutritional requirements of non-*Saccharomyces* yeast (NISSEN et al. 2003), *S'codes ludwigii* depletes one or more components of the medium that is needed for the normal carbohydrate utilization, metabolism and growth of the brewer's yeast. In this case a thorough investigation should be performed on factors effecting the carbohydrate (especially maltose and

maltotriose) metabolism and uptake of brewer's yeast, as well as on the change of nitrogen and vitamin content of the medium.

One of the factors mentioned as having inhibitory effect on the fermentation ability and growth of brewer's yeasts is nitrogen deficiency. In case of nitrogen shortage, glucose in the medium induces a process that causes the inactivation of maltose transporters. In this case not only the synthesis of new maltose transporters are hindered, but existing transporters disappear (RAUTIO&LONDESBOROUGH 2000).

In a review article BISSON (1999) wrote that vitamin requirement of mixed-culture fermentations are greater than the usual. Vitamins are used up faster if fermentation is made at low temperature with the mixed culture of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. The low temperature favours the non-*Saccharomyces* yeasts, and that leads to faster vitamin consumption, slowing further down the fermentation activity of *Saccharomyces* yeast.

4. Application of biotechnological methods for the production of low-alcoholic beer

Nowadays, two technological methods are used for the production of low-alcoholic and non-alcoholic beers: (1) alcohol is removed by evaporation, dialysis or reverse osmosis from beer produced with traditional technology (KUNZE 1999, PILIPOVIK&RIVEROL 2005); (2) stopped fermentation is performed at high temperature (15-20°C) and short contact time (0.5-8 hours) or at low temperature (0-5°C) and longer contact time (up to 24 hours) (VAN IERSEL et al. 1998).

Application of special yeast that produce less alcohol due to their altered carbohydrate utilization (not fermenting maltose) are mentioned in the literature (KUNZE 1999), but I have no knowledge of its practical use.

Assessing my previous results I found that if fermentation is initiated with a 1:12 to 1:20 ratio of the mixed culture of *Saccharomyces ludwigii* and *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70, then ethanol concentration in the final product remains below 1.5 percent by volume. Regarding aroma compounds low concentration of esters causes problems, but to some extent brewer's yeast compensates some of the deficiencies of the special yeast. I performed further fermentations to specify the initial cell ratio, and I found that 1:15 ratio is suitable.

Laboratory scale production of modified carbohydrate content wort

During fermentations it was proved on several occasions that normal wort is not an ideal medium for the *Saccharomyces ludwigii* yeast. Great amount of maltose (approx. 50 g/l) is left in the product after fermentation. Although sweetening power of maltose is less than of sucrose, this amount may cause sweet taste in the final product and may lead to microbiological spoilage. Modifying the traditional technology I made wort containing significantly less fermentable carbohydrates – glucose, fructose, maltose and maltotriose – by (1) using mixture of pilsner, dark

and crystal malts, and (2) by omitting 62°C temperature rest that favours the activity of β -amylase during mashing, thus letting α -amylase to perform starch degradation at 72°C. Carbohydrate content of these worts was 25 to 50 percent less than that of normal wort.

Laboratory scale production of beer

By fermenting the above mentioned modified carbohydrate content wort with 1:15 ratio of the mixed culture of *Saccharomyces ludwigii* (maltose negative) yeast and *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 brewer's yeast I made low-alcoholic beer (< 2 V/V%).

Scent of the product was quite fragrant that appeared in its taste, as well. Most probably due to the special yeast the beer was fruity and definitely honey-like flavoured. Residual maltose did not cause sweet off-flavour. Beer lacked body, which is characteristic of low-alcoholic beers in general. Upon the whole, the product was pleasant and suitable for consumption. As a next step I plan the scaling up of production to pilot plant size.

Production of low-alcoholic beer with immobilized traditional and killer brewer's yeast in a continuous fermentation system

Production of low-alcoholic and non-alcoholic beer is possible with immobilized yeast cells. Immobilization induces several physiological changes in the yeast cells. Combination of low temperature, short contact time and immobilization will result product with low alcohol content. In my research work I aimed not only to produce such beer, but to compare fermentation abilities of a traditional and well-known brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70), and a killer brewer's yeast that was constructed by protoplast fusion (as described previously). Examination of the two yeast strains was performed in a continuous fermentation system.

Both the *S. cerevisiae* WS 34/70 (which was one of the parental strains in the protoplast fusion) and the killer brewer's yeast cells were immobilized in Ca-alginate beads with the standard dripping procedure. During the continuous fermentation flow rate of wort was changed between 60 and 150 ml/h, carbohydrate utilization, alcohol and aroma compounds were analyzed.

Based on molecular analysis, genetic composition of the parental brewer's yeast and the fusion product killer brewer's yeast were very similar. Data collected during continuous fermentations with the two yeast strains proved that the killer brewer's yeast possesses very similar fermentation ability as the parental brewer's yeast.

With this method a low-alcoholic product (< 2 V/V%) was made, just like with the mixed-culture of a brewer's yeast and a non-brewer's yeast.

8 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. A *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő törzs és a *Saccharomyces cerevisiae* K7 (K1 killer típusú) killer élesztőtörzs felhasználásával, protoplaszt fúzióval létrehoztam egy killer aktivitással rendelkező sörélesztő törzset, mely hosszú időn keresztül, genetikailag stabilan megtartja killer aktivitását.
2. Szelektáltam egy maltózt nem erjesztő élesztőtörzset – *Saccharomyces ludwigii* –, amelyet a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztővel kevert kultúrában alkalmazva alkoholszegény termék állítható elő, mely a hagyományos sörökhöz hasonló aroma összetétellel rendelkezik. Megállapítottam a sörélesztő-idegen élesztő optimális arányát.
3. Kísérletesen igazoltam, hogy a *Saccharomyces ludwigii* a *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztőre gátló hatást fejt ki és megállapítottam, hogy ez nem sejt-sejt kontaktus, illetve killer aktivitás eredménye.
4. Igazoltam, hogy a *Saccharomyces ludwigii* élesztő általam vizsgált törzse nem rendelkezik killer aktivitással, killer toxint nem termel.
5. A módosított szénhidrát tartalmú sörlevet *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztő és *Saccharomyces ludwigii* élesztő 1:15 arányú kevert kultúrájával erjesztve alkoholszegény sört állítottam elő.

9 FELHASZNÁLT IRODALOM

- AIVASIDIS A. (1996): Another look at immobilized yeast systems. *Cerevisia, Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 21 (1) 27-32. p.
- ALFENORE S., DÉLIA M. L., STREHAIANO P. (2003): Use of ATP measurements by bioluminescence to quantify yeast's sensitivity against a killer toxin. *Analytica Chimica Acta*, 495 217–224. p.
- Analytica-EBC (1999): Method 9.24.2. Verlag Hans Carl Getranke-Fachverlag, Nürnberg.
- ASANZA TERUEL M. L., GONTIER E., BIENAIME C., NAVA SAUCEDO J. E., BARBOTIN J.-N. (1997): Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with κ -carragenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 21 (5) 314-320. p.
- BACK W. (2005): Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl. 317. p.
- BARNEY M. C., JANSEN G. P., HELBERT J. R. (1980): Use of spheroplast fusion and genetic transformation to introduce dextrin utilization into *Saccharomyces uvarum*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 38 (1) 49-53. p.
- BAUDET C., BARBOTIN J.-N., GUESPIN-MICHEL J. (1983): Growth and sporulation of entrapped *Bacillus subtilis* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (1) 297-301. p.
- BEAL A. D., MOTTRAM D. S. (1994): Compounds contributing to the characteristic aroma of malted barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (12) 2880-2884. p.
- BICKERSTAFF G. F. (1997): Immobilization of enzymes and cells. Some practical consideration. In: Bickerstaff G. F. (szerk.) *Immobilization of enzymes and cells*. Totowa, New Jersey: Humana Press
- BISSON L. F. (1999): Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50 (1) 107-119. p.
- BORTOL A., NUDEL C., FRAILA E., DE TORRES R., GIULIETTI A., SPENCER J. F. T., SPENCER D. (1986): Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24 414-416. p.
- BRÁNYIK T., VICENTE A., CRUZ J. M. TEIXEIRA J. (2002): Continuous primary fermentation with brewing yeast immobilized on spent grains. *Journal of the Institute of Brewing*, 108 (4) 410-415. p.

- BREINIG F., SENDZIK T., EISFELD K., SCHMITT J. (2006): Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (10) 3810-3815. p.
- BREITENBÜCHER B. (1995): Fluidized bed fermenters for the continuous production of non-alcoholic beer with open-pore sintered glass carriers. 77-89. p. In: *EBC Monograph XXIV. EBC Symposium Immobilized Yeast Application in the Brewing Industry, Espoo, Finland October 1995*. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 259. p.
- BRODELIUS P., VANDAMME E. J. (1991): Immobilized cell systems. 405-464. p. In: Rehm H. J., Reed G. (szerk.) *Biotechnology. A Comprehensive Treatise in 8 Volumes. Volume 7/a*. Weinheim: VCH
- BUZZINI P., CORAZZI L., TURCHETTI B., BURATTA M., MARTINI A. (2004): Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238 359-365. p.
- CAMPBELL I. (2000): Brewing yeast selection. *Microbiology Today*, 27 (8) 122-124. p.
- CHEN K.-C., HUANG C.-T. (1988): Effects of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel beads upon bead structure and oxygen transfer characteristics. *Enzyme and Microbial Technology*, 10 (5) 284-292. p.
- CHEN W. B., HAN Y. F., JONG S. C., CHANG S. C. (2000): Isolation, Purification, and Characterization of a Killer Protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (12) 5348–5352. p.
- CHUN G.-T., AGATHOS S. N. (1991): Comparative studies of physiological and environmental effects on the production of cyclosporin A in suspended and immobilized cells of *Tolyposcladium inflatum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 37 (3) 256-265. p.
- CIANI M., PEPE V. (2002): The influence of pre-fermentative practices on the dominance of inoculated yeast starter under industrial conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (5) 573-578. p.
- CONDE J., FINK G. R. (1976): A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73 (10) 3651-3655. p.
- CONSTANTÍ M., REGUANT C., POBLET M., ZAMORA F., MAS A., GUILLAMÓN J. M. (1998): Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 41 (3) 169-175. p.
- DE BACKER L., WILLAERT R. G., BARON G. V. (1996): Modelling of immobilised bioprocesses. In: Willaert R. G., Baron G. V., De Backer L. (szerk.) *Immobilized living cell systems. Modelling and experimental methods*. Chichester, England: John Wiley & Sons

- DE FIGUEROA L. I., DE RICHARD M. F., DE VAN BROOCK M. R. (1984): Interspecific protoplast fusion of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces diastaticus*. *Biotechnology Letters*, 6 (4) 269-274. p.
- DEÁK T. (1998): Élesztőgombák a természetben és az iparban. Budapest: Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó. 243. p.
- DERVAKOS G. A., WEBB C. (1991): On the merits of viable-cell immobilization. *Biotechnology Advances*, 9 (4) 559-612. p.
- DIAS S. M. M., NOVAIS J. M., CABRAL J. M. S. (1982): Immobilization of yeasts on titanium activated inorganic supports. *Biotechnology Letters*, 4 (3) 203-208. p.
- DILLENHÖFER W., RÖNN D. (1996): Kontinuierliche Bierreifung. *Brauwelt*, 136 (46/47) 2295-2296. p.
- DORAN P. M., BAILEY J. E. (1986): Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatine. *Biotechnology and Bioengineering*, 28 (1) 73-87. p.
- ENARI T.-M. (1999): From beer to molecular biology. The evolution of industrial biotechnology. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl. 120. p.
- EXTREMERA A. L., MARTIN I., MONTOYA E. (1982): A new killer toxin produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 5 (1) 17-19. p.
- FERENCZY L., MARÁZ A. (1977): Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 268 524-525. p.
- FLEET G. H. (2003): Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86 (1) 11-22. p.
- FREDRICKSON A. G. (1977): Behaviour of mixed cultures of microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 31 63-87. p.
- GALAZZO J. L., BAILEY J. E. (1989): *In vivo* Nuclear Magnetic Resonance analysis of immobilization effects on glucose metabolism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33 (10) 1283-1289. p.
- GALAZZO J. L., BAILEY J. E. (1990): Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, 36 (4) 417-426. p.
- GAUSE G. F. (1932): Experimental studies on the struggle for existence. I. Mixed population of two species of yeast. *Journal of Experimental Biology*, 9 389-402. p.
- GUNGE N., TAMARU A., OZAWA F., SAKAGUCHI K. (1981): Isolation and characterization of linear Deoxyribonucleic Acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of Bacteriology*, 145 (1) 382-390. p.

- HAHN-HÄGERDAL B. (1990): Physiological aspects of immobilized cells: a general overview. 481-486. p. In: de Bont J. A. M., Visser J., Mattiasson B., Tramper J. (szerk.) *Physiology of immobilized cells, Proceedings of an International Symposium held at Wageningen, The Netherlands, 10-13 December 1989*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V.
- HALE W. G., MARGHAM J. P., SAUNDERS V. A. (1997): *Biológia Értelmező Szótár*. Budapest - Maidenhead, England: Panem-McGraw-Hill. 716. p.
- HAMMOND J. R. M., ECKERSLEY K. W. (1984): Fermentation properties of brewing yeast with killer character. *Journal of the Institute of Brewing*, 90 167-177. p.
- HANSEN E. H., NISSEN P., SOMMER P., NIELSEN J. C. ARNEBORG N. (2001): The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 91 (3) 541-547. p.
- HEGYESNÉ VECSERI B. (2004): Az ásványi anyag tartalom tanulmányozása a sörgyártás műveleti lépései során. *Doktori értekezés*, Budapesti Corvinus Egyetem. Budapest. 122. p.
- HYTTINEN I., KRONLÖF J., HARTWALL P. (1995): Use of porous glass at Hartwall Brewery in the maturation of beer with immobilized yeast. 55-65. p. In: *EBC Monograph XXIV. EBC Symposium Immobilized Yeast Application in the Brewing Industry, Espoo, Finland October 1995*. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 259. p.
- INANÇ E., MILLER J. E., DIBIASIO D. (1996): Effect of oxygen supply on metabolism of immobilized and suspended *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51 697-702. p.
- ISERENTANT D. (1989): Genetically manipulated yeasts: methods, facts and future. *Louvain Brewing Letters*, 2 (3/4) 3-15. p.
- ISERENTANT D., VAN DE SPIEGLE K. (1988): The influence of the recombination system on the protoplast fusion of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 46 61-63. p.
- IZGÜ F., ALTINBAY D. (2004): Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an exo- β -1,3-glucanase. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 68 (3) 685-693. p.
- IZGÜ F., ALTINBAY D., DERINEL Y. (2004): Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*. *Food Microbiology*, 21 635-640. p.
- JIN Y.-L., SPEERS R. A. (1998): Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*. 31 (6-7) 421-440. p.
- JUNTER G.-A., COQUET L., VILAIN S., JOUENNE T. (2002): Immobilized-cell physiology: current data and the potentialities of proteomics. *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (3) 201-212. p.

- KAO K. N., MICHAYLUK M. R. (1974): A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplast. *Planta*, 115 (4) 355-367. p.
- KIY T., TIEDTKE A. (1993): Effects of immobilization on growth, morphology, and DNA content of the ciliated protozoon *Tetrahymena thermophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 106 (1) 117-122. p.
- KLEIN J., ZIEHR H. (1990): Immobilization of microbial cells by adsorption. *Journal Biotechnology*, 16 (1) 1-16. p.
- KLINGEBERG M., VORLOP K. D., ANTRAKINIAN G. (1990): Immobilization of anaerobic thermophilic bacteria for the production of cell-free thermostable α -amylases and pullulanases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33 (5) 494-500. p.
- KOURKUTAS Y., BEKATOROU A., BANAT I. M., MARCHANT R., KOUTINAS A. A. (2004): Immobilization technologies and support materials suitable in alcoholic beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21 (4) 377-397. p.
- KRÜGER, E., ANGER, H-M (1990) Kennzahlen zur Betriebskontrolle und Qualitätsbeschreibung in der Brauwirtschaft. Daten über Roh- und Hilfsstoffe, Halbfertig- und Fertigprodukte bei der Bierbereitung. Behr's Verlag, Hamburg, pp. 4-5, 13, 18, 22-23
- KUNZE W. (1999): Technology Brewing and Malting. Berlin: VLB. 726. p.
- LAU P. S., TAM N. F. Y., WONG Y. S. (1998): Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 63 (2) 115-121. p.
- LINKO M., VIRKAJAERVI I., KRONLÖF J., PAJUNEN E. (1998): Method for the maturation of beer. Patent No. WO9849264
- LUDOVICO P., SOUSA M. J., SILVA M. T., LEÃO C., CÔRTE-REAL M. (2001): *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147 (9) 2409-2415. p.
- LYNGBERG O. K., THIAGARAJAN V., STEMKE D. J., SCHOTTEL J. L., SCRIVEN L. E., FLICKINGER M. C. (1999): A patch coating method for preparing biocatalytic films of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 62 (1) 44-55. p.
- MAGLIANI W., CONTI S., GERLONI M., BERTOLOTTI D., POLONELLI L. (1997): Yeast Killer Systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (3) 369-400. p.
- MALCORPS P., CHEVAL J. M., JAMIL S., DUFOUR J. P. (1991): A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 49 47-53. p.
- MARÁZ A., ZÁKÁNY F., LOVENYÁK M. (1994): Improvement of brewing yeasts: Construction of killer and glucoamylase producing strains. *Hungarian Agricultural Research*, 3 (1) 34-41. p.

- MARQUINA D., BARROSO J., SANTOS A., PEINADO J. M. (2001): Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiological Research*, 156 387-391. p.
- MARTINAC B., ZHU H., KUBALSKI A., ZHOU X., CULBERTSON M., BUSSEY H., KUNG C. (1990): Yeast killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 6228-6232. p.
- MCCLELLAN C. J., DOES A. L., BISSON L. F. (1989): Characterization of hexose uptake in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40 (1) 9-15. p.
- MCMURROUGH I. (1995): Scope and limitations for immobilized cell systems in the brewing industry. 2-12. p. In: *EBC Monograph XXIV. EBC Symposium Immobilized Yeast Application in the Brewing Industry, Espoo, Finland October 1995*. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 259. p.
- MIDDELBEEK E. J., HERMANS J. M. H., STUMM C., MUYTJENS H. L. (1980): High Incidence of sensitivity to yeast killer toxins among *Candida* and *Torulopsis* isolates of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17 (3) 350-354. p.
- MISINSZKI A. (2000) Sörök aromaanyagainak vizsgálata, különös tekintettel az észter-tartalomra. Diplomamunka. Szent István Egyetem Élelmiszertudományi Kar
- MITCHELL D. J., BEVAN E. A. (1983) ScV “Killer” viruses in yeast. 371-419. p. In: Spencer J. F. T., Spencer D. M., Smith A. R. W. (Eds): *Yeast genetics: Fundamental and Applied Aspects*. New York: Springer-Verlag
- MUSMANNO R. A., DI MAGGIO T., CORATZA G. (1999): Studies on strong and weak killer phenotypes of wine yeasts: production, activity of toxin in must, and its effect in mixed culture fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 87 932-938. p.
- NARZISS L. (1981): A sörgyártás. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó. 346. p.
- NEDOVIC V. A., DURIEUXB A., VAN NEDERVELDE L., ROSSEELS P., VANDEGANS J., PLAISANT A.-M., SIMON J.-P. (2000): Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (9-10) 834-839. p.
- NEDOVIĆ V. A., OBRADOVIĆ B., LESKOŠEK-ČUKALOVIĆ I., TRIFUNOVIĆ O., PEŠIĆ R., BUGARSKI B. (2001): Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. *Process Biochemistry*, 37 17-22. p.
- NEVOIGT E., PILGER R., MAST-GERLACH E., SCHMIDT U., FREIHAMMER S., ESCHENBRENNER M., GARBE L., STAHL U. (2002): Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Research*, 2 225-232. p.
- NISSSEN P., ARNEBORG N. (2003): Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 180 (4) 257-263. p.

- NISSEN P., NIELSEN D., ARNEBORG N. (2003): Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, 20 (4) 331-341. p.
- NITZSCHE F., HÖHN G., MEYER-PITTROFF R., BERGER S., POMMERSHEIM R. (2001): A new way for immobilized yeast systems: secondary fermentation without heat treatment. 486-494. p. In: *Proceedings of the 28th EBC Congress, Budapest, 2001*. CD-ROM
- NORTON S., D'AMORE T. (1994): Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme and Microbial Technology* 16 (5) 365-375. p.
- NOTHAFT A. (1995): The start-up of an immobilized yeast system for secondary fermentation at Brahma. 41-54. p. In: *EBC Monograph XXIV. EBC Symposium Immobilized Yeast Application in the Brewing Industry, Espoo, Finland October 1995*. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 259. p.
- NOVOTNÁ D., FLEGELOVÁ H., JANDEROVÁ B. (2004): Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4 803-813. p.
- OMAR S. H. (1993): Oxygen diffusion through gels employed for immobilization. *Applied microbiology and biotechnology*, 40 (2-3) 173-181. p.
- PAJUNEN E. (1995): Immobilized yeast lager beer maturation: DEAE-cellulose at Synebrychoff. 24-40. p. In: *EBC Monograph XXIV. EBC Symposium Immobilized Yeast Application in the Brewing Industry, Espoo, Finland October 1995*. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 259. p.
- PARASCANDOLA P., DE ALTERIIS E. (1996): Pattern of growth and respiratory activity of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) cells growing entrapped in an insolubilized gelatine gel. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 23 (1) 7-12. p.
- PASHOVA S., SLOKOSKA L., SHEREMETSKA P., KRUMOVA E., VASILEVA L., ANGELOVA M. (1999): Physiological aspects of immobilised *Aspergillus niger* cells producing polymethylgalacturonase. *Process Biochemistry*, 35 (1) 15-19. p.
- PERPÈTE P., COLLIN S. (1999): Contribution of 3-methylthiopropionaldehyde to the warty flavour of alcohol-free beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 2374-2378. p.
- PILIPOVIK M. V., RIVEROL C. (2005): Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 69 437-441. p.
- PILKINGTON H., MARGARITIS A., MENSOUR N., RUSSEL I. (1998): Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 104 (1) 19-31. p.

- PILKINGTON H., MARGARITIS A., MENSOUR N., SOBCZAK J., HANCOCK I., RUSSEL I. (1999): Kappa-carrageenan gel immobilisation of lager brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 105 (6) 398-404. p.
- POLONELLI L., MORACE G. (1986): Re-evaluation of the yeast killer phenomenon. *Journal of Clinical Microbiology*, 24 (5) 866-869. p.
- POMMIER S., STREHAIANO P., DÉLIA M.L. (2005): Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: a case of amensalism. *International Journal of Food Microbiology*, 100 131-139. p.
- POULSEN L. V. (1999): Microbial Biofilm in food processing. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 32 321-326. p.
- PRETORIUS I. S. (2000): Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16 (8) 675-729. p.
- PRIEST F. G., CAMPBELL I. (Szerk.) (1996): *Brewing Microbiology*. London: Chapman & Hall. 306. p.
- RAUTIO J., LONDESBOROUGH J. (2000): Maltose transporter activity through brewing fermentations. *EBC Brewing Science Group Bulletin*, 184-193. p.
- ROMANO P., FIORE C., PARAGGIO M., CARUSO M., CAPECE A. (2003): Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86 (1-2) 169-180. p.
- ROSE A. H., HARRISON J. S. (Szerk.) (1970): *The Yeasts*. Volume 1, 2, 3. London and New York: Academic Press.
- RUSSEL I., STEWART G. G. (1985): Valuable techniques in the genetic manipulation of industrial yeast strains. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 43 84-90. p.
- SANTOS-ROSA F., GALVÁN F., VEGA J. M. (1989): Biological viability of *Chlamydomonas reinhardtii* cells entrapped in alginate beads for ammonium photoproduction. *Journal of Biotechnology*, 9 (3) 209-219. p.
- SASAKI T., WATARI J., KOHGO M., NISHIKAWA N., MATSUI Y. (1984): Breeding of a brewer's yeast possessing anticontaminant properties. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 42 164-166. p.
- SCHMITT M. J., BREINIG F. (2002): The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26 257-276. p.
- SCHMITT M. J., NEUHAUSEN F. (1994): Killer toxin-secreting double-stranded RNA mycoviruses in the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Virology*, 68 (3) 1765-1772. p.

- SCHMITT M. J., PORAVOU O., TRENZ K., REHFELDT K. (1997): Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *Journal of Virology*, 71 (11) 8852-8855. p.
- SCHMITT M. J., TIPPER D. J. (1990): K28, A Unique Double-Stranded RNA Killer Virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 10 (9) 4807-4815. p.
- SHINDO S., SAHARA S., WATANABE N., KOSHINO (1994): Main fermentation with immobilized yeast using fluidized-bed reactor. 109-113. p. In: *Proceedings of the 23rd Convention of the Institute of Brewing, Asia Pacific Section, 10-15 April, 1994, Sydney, Australia*
- SHINONAGA M.-A., KAWAMURA Y., YAMANE T. (1992): Immobilization of yeast cells with cross-linked chitosan beads. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74 (2) 90-94. p.
- SHREVE G. S., VOGEL T. M. (1993): Comparison of substrate utilization and growth kinetics between immobilized and suspended *Pseudomonas* cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 41 (3) 370-379. p.
- SKATRUD P. L., JAECK D. M., KOT E. J., HELBERT J. R. (1980): Fusion of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic manipulation and reconstruction of a brewer's yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 38 1-5. p.
- ŠMOGROVIČOVÁ D., DÖMÉNY Z. (1999): Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilized yeasts. *Process Biochemistry*, 34 (8) 785-794. p.
- ŠMOGROVIČOVÁ D., DÖMÉNY Z., NAVRÁTIL M., DVOŘÁK P. (2001): Continuous beer fermentation using polyvinyl alcohol entrapped yeast. 477-485. p. In: *Proceedings of the 28th EBC Congress, Budapest, 2001*. CD-ROM
- SPENCER J. F. T., SPENCER M. D. (1977): Hybridization of non-sporulating and weakly sporulating strains of brewer's and distiller's yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 83 287-289. p.
- TAIPA M. A., CABRAL J. M. S., SANTOS H. (1993): Comparison of glucose fermentation by suspended and gel-entrapped yeast cells: an *in vivo* Nuclear Magnetic Resonance study. *Biotechnology and Bioengineering*. 41 (6) 647-653. p.
- TAKASUKA T., KOMIYAMA T., FURUICHI Y., WATANABE T. (1995): Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular and Molecular Biology Research*, 41 (6) 575-581. p.
- TANO-DEBRAH K., FUKUYAMA S., OTONARI N., TANIGUCHI F., OGURA M. (1999): An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils. *Bioresource Technology*, 69 (2) 133-139. p.

- TISNADJAJA D., GUTIERREZ N. A., MADDOX I. S. (1996): Citric acid production in a bubble-column reactor using cells of the yeast *Candida guilliermondii* immobilized by adsorption onto sawdust. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (5) 343-347. p.
- TRÉTON B. Y., LE DALL M-T., HESLOT H. (1985): Virus-like particles from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics*, 9 (4) 279-284. p.
- UMEMOTO S., MITANI Y., SHINOTSUKA K. (1998): Primary fermentation with immobilized yeast in a fluidized bed reactor. *Technical Quarterly of the Master Brewers' Association of the Americas*, 35 (2) 58-61. p.
- VAGNOLI P., MUSMANNO R. A., CRESTI S., DI MAGGIO T., CORATZA G. (1993): Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany region of Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (12) 4037-4043. p.
- VAN DE WINKEL L. (1995): Pilot-scale evaluation of silicon carbide immobilized yeast systems for continuous alcohol-free beer production. 90-98. p. In: *EBC Monograph XXIV. EBC Symposium Immobilized Yeast Application in the Brewing Industry, Espoo, Finland October 1995*. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 259. p.
- VAN DE WINKEL L., DE VUYST L. (1997): Immobilized yeast cell systems in today's breweries and tomorrow's. *Cerevisia, Belgian Journal of Brewing & Biotechnology*, 22 (1) 27-31. p.
- VAN DIEREN B. (1995): Yeast metabolism and the production of alcohol-free beer. 66-76. p. In: *EBC Monograph XXIV. EBC Symposium Immobilized Yeast Application in the Brewing Industry, Espoo, Finland October 1995*. Nürnberg: Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, 259. p.
- VAN IERSEL M. F. M., BROUWER-POST E., ROMBOUTS F. M., ABEE T. (2000): Influence of yeast immobilization on fermentation and aldehyde reduction during the production of alcohol-free beer. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 602-607. p.
- VAN IERSEL M. F. M., MEERSMAN E., ARNTZ M., ROMBOUTS F. M., ABEE T. (1998): Effect of environmental conditions on flocculation and immobilisation of brewer's yeast during production of alcohol-free beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 104 (3) 131-136. p.
- VAN IERSEL M. F. M., MEERSMAN E., SWINKELS W., ABEE T., ROMBOUTS F. M. (1995): Continuous production of non-alcoholic beer by immobilized yeast at low temperature. *Journal of Industrial Microbiology*, 14 495-501. p.
- VAN IERSEL M. F. M., VAN DIEREN B., ROMBOUTS F. M., ABEE T. (1999): Flavor formation and cell physiology during the production of alcohol-free beer with immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 24 407-411. p.
- VAN SOLINGEN P., VAN DER PLAAT J. B. (1977): Fusion of yeast spheroplast. *Journal of Bacteriology*, 130 (2) 946-947. p.

- VERACHTERT H., DAWOUD E. (1990): Yeast in mixed cultures. *Louvain Brewing Letters*, 3 (1/2) 15-39. p.
- VERBELEN P. J., DE SCHUTTER D. P., DELVAUX F., VERSTAPPEN K. J., DELVAUX F. R. (2006): Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, 28 (19) 1515-1525. p.
- VERHOEF B. (2002): Sörök enciklopédiája. Pécs: Alexandra Kiadó. 447. p.
- VIEGAS C. A., ROSA M. F., SA-CORREIA I., NOVAIS J. M. (1989): Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (1) 21-28. p.
- VIRKAJÄRVI I. (2001): Feasibility of continuous main fermentation of beer using immobilized yeast. Doctoral dissertation. Espoo: VTT (Technical Research Centre of Finland) Publication. 92. p.
- WALKER G. M., MCLEOD A. H., HODGSON V. J. (1995): Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127 213-222. p.
- WILLAERT R. G., BARON G. (1993): Growth kinetics of gel-immobilized yeast cells studied by on-line microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30 (3) 347-352. p.
- WILLAERT R. G., BARON G. DE BACKER L. (1996): Immobilized living cell systems. Modelling and experimental methods. Chichester, England: John Wiley & Sons 1-20. p.
- WILSON N. G., BRADLEY G. (1997): A study of a bacterial immobilization substratum for use in the bioremediation of crude oil in asaltwater system. *Journal Applied Microbiology*, 83 (4) 524-530. p.
- YAMAUCHI Y., KASHIHARA T., MURAYAMA H., NAGARA A., OKAMOTO T., MATAWARY M. (1994): Scale up of immobilized yeast bioreactor for continuous fermentation of beer. *Technical Quarterly of the Master Brewer's Association of the Americas*, 31 (3) 90-94. p.
- YOUNG T. W. (1981): The genetic manipulation of killer character into brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 87 292-295. p.
- YOUNG T. W. (1983): The properties and brewing performance of brewing yeasts possessing killer character. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 41 1-4. p.
- YOUNG T. W., YAGIU M. (1978) A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie van Leeuwenhoek*, 44 (1) 59-77. p.
- A Carlsberg Sörgyár története. Kikeresve 2006. október 26-án a Carlsberg Sörgyár honlapjáról. Internet cím: <http://info.carlsberg.com> (Company/Heritage/Company history)

10 MELLÉKLETEK

I. táblázat Kevert kultúras főerjesztés. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (II.a erjesztési kísérlet)

II. táblázat Kevert kultúras utóerjesztés. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (II.b erjesztési kísérlet)

III. táblázat Kevert kultúras erjesztés megnövelt idegen élesztő aránnyal. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (III. erjesztési kísérlet)

IV. táblázat Kevert kultúras erjesztés *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztővel és *Saccharomycodes ludwigii* élesztővel. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (IV. erjesztési kísérlet)

I. ábra. Szénhidrát felhasználás az „A” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:10 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 8°C.

II. ábra. Szénhidrát felhasználás az „A” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat elő- és főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:15 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 8°C

III. ábra. Szénhidrát felhasználás az „B” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat elő- és főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:10 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 8°C.

IV. ábra. Szénhidrát felhasználás az „B” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:20 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 8°C

V. ábra. Szénhidrát felhasználás az „A” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:10 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 20°C.

VI. ábra. Szénhidrát felhasználás az „A” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:30 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 20°C.

VII. ábra. Szénhidrát felhasználás az „B” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:30 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 20°C

I.a táblázat Kevert kultúras főerjesztés. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (*S. cerevisiae*-*S. codes ludwigii*, *S. cerevisiae*-*S. exiguus*)

		<i>S. cerevisiae</i> – <i>S. codes ludwigii</i>			<i>S. cerevisiae</i> – <i>S. exiguus</i>		
		SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %	SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %
1:1	KEZDETI	7,91 x 10 ⁶	50	50	1,63 x 10 ⁷	50	50
	VÉGSŐ	1,14 x 10 ⁷	75,5	24,5	3,42 x 10 ⁷	72	28
1:2	KEZDETI	6,21 x 10 ⁶	33	67	1,34 x 10 ⁷	33	67
	VÉGSŐ	1,65 x 10 ⁷	70	30	3,69 x 10 ⁷	71,1	28,9
1:5	KEZDETI	1,04 x 10 ⁷	16,6	83,4	1,18 x 10 ⁷	16,6	83,4
	VÉGSŐ	1,93 x 10 ⁷	58,5	41,5	8,80 x 10 ⁷	67,6	32,4
1:10	KEZDETI	9,66 x 10 ⁶	9,1	90,9	1,09 x 10 ⁷	9,1	90,9
	VÉGSŐ	5,03 x 10 ⁷	41,3	58,7	8,53 x 10 ⁷	66,3	33,7

I.b táblázat Kevert kultúras főerjesztés. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (*S. cerevisiae*-*S. delbrueckii*, *S. cerevisiae*-*T. delbrueckii*)

		<i>S. cerevisiae</i> – <i>S. delbrueckii</i>			<i>S. cerevisiae</i> – <i>T. delbrueckii</i>		
		SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %	SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %
1:1	KEZDETI	1,66 x 10 ⁷	50	50	1,52 x 10 ⁷	50	50
	VÉGSŐ	2,83 x 10 ⁷	82,8	17,2	3,57 x 10 ⁷	82,4	17,6
1:2	KEZDETI	1,37 x 10 ⁷	33	67	1,24 x 10 ⁷	33	67
	VÉGSŐ	2,24 x 10 ⁷	73,1	26,9	2,48 x 10 ⁷	72,1	27,9
1:5	KEZDETI	1,16 x 10 ⁷	16,6	83,4	1,13 x 10 ⁷	16,6	83,4
	VÉGSŐ	1,04 x 10 ⁸	52,5	47,5	7,63 x 10 ⁷	73,7	26,3
1:10	KEZDETI	1,07 x 10 ⁷	9,1	90,9	1,05 x 10 ⁷	9,1	90,9
	VÉGSŐ	1,33 x 10 ⁸	33	67	9,10 x 10 ⁷	54,7	45,3

II.a táblázat Keveret kultúras utóerjesztés. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (*S. cerevisiae-S'codes ludwigii*, *S. cerevisiae-S. exiguus*)

		<i>S. cerevisiae – S'codes ludwigii</i>			<i>S. cerevisiae – S. exiguus</i>		
		SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %	SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %
1:1	KEZDETI	1,65 x 10 ⁷	50	50	1,84 x 10 ⁷	50	50
	VÉGSŐ	3,69 x 10 ⁷	69,9	30,1	5,51 x 10 ⁷	61,7	38,3
1:2	KEZDETI	1,27 x 10 ⁷	33	67	1,41 x 10 ⁷	33	67
	VÉGSŐ	1,79 x 10 ⁷	67,6	32,4	3,45 x 10 ⁷	54,4	45,6
1:5	KEZDETI	1,15 x 10 ⁷	16,6	83,4	1,03 x 10 ⁷	16,6	83,4
	VÉGSŐ	1,21 x 10 ⁷	50	50	3,34 x 10 ⁷	55,1	44,9
1:10	KEZDETI	1,06 x 10 ⁷	9,1	90,9	9,52 x 10 ⁶	9,1	90,9
	VÉGSŐ	1,80 x 10 ⁷	21,8	78,2	3,30 x 10 ⁷	42,9	57,1

II.b táblázat Keveret kultúras utóerjesztés. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-Idegen élesztő arányok (*S. cerevisiae-S. delbrueckii*, *S. cerevisiae-T. delbrueckii*)

		<i>S. cerevisiae – S. delbrueckii</i>			<i>S. cerevisiae – T. delbrueckii</i>		
		SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %	SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %
1:1	KEZDETI	1,84 x 10 ⁷	50	50	1,69 x 10 ⁷	50	50
	VÉGSŐ	1,97 x 10 ⁷	62,6	37,4	4,56 x 10 ⁷	58,9	41,1
1:2	KEZDETI	1,41 x 10 ⁷	33	67	1,29 x 10 ⁷	33	67
	VÉGSŐ	2,92 x 10 ⁷	60	40	2,08 x 10 ⁷	66,9	33,1
1:5	KEZDETI	1,15 x 10 ⁷	16,6	83,4	1,08 x 10 ⁷	16,6	83,4
	VÉGSŐ	2,73 x 10 ⁷	48,8	51,2	4,45 x 10 ⁷	45,8	54,2
1:10	KEZDETI	1,06 x 10 ⁷	9,1	90,9	9,94 x 10 ⁶	9,1	90,9
	VÉGSŐ	4,38 x 10 ⁷	34,3	65,7	3,23 x 10 ⁷	35,4	64,6

III.a táblázat Kevert kultúras erjesztés megnövelt vadélesztő aránnyal. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (*S. cerevisiae-S'codes ludwigii*, *S. cerevisiae-S. exiguus*)

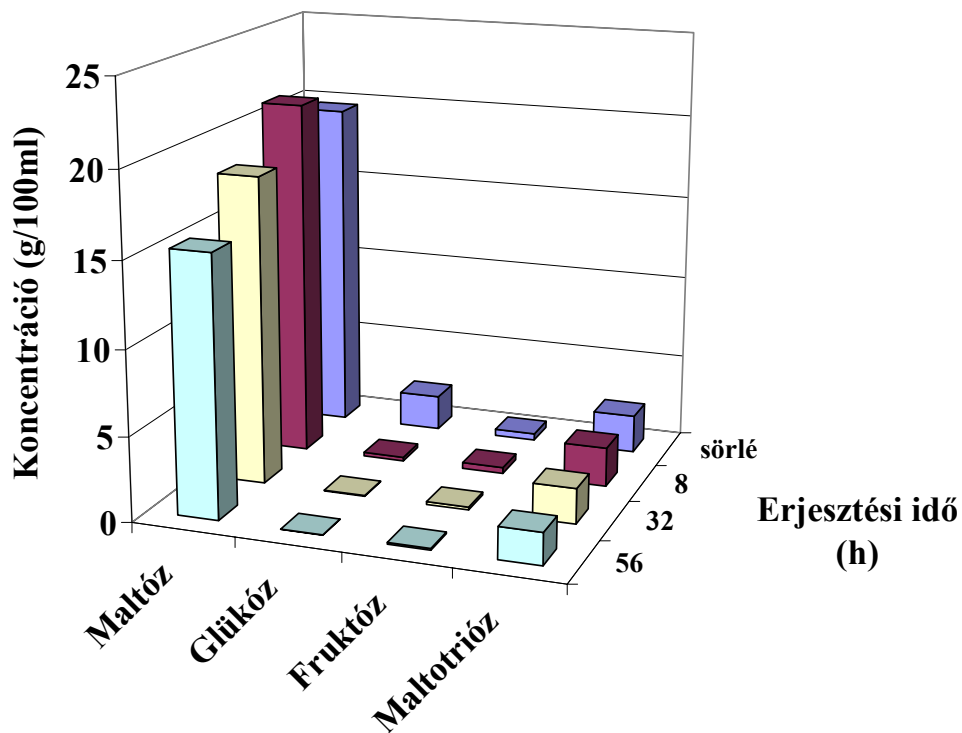
		<i>S. cerevisiae – S'codes ludwigii</i>			<i>S. cerevisiae – S. exiguus</i>		
		SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %	SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %
1:12	KEZDETI	9,43 x 10 ⁶	7,6	92,4	1,06 x 10 ⁷	7,6	92,4
	VÉGSŐ	2,21 x 10 ⁷	41,1	58,9	6,46 x 10 ⁷	74,8	25,2
1:15	KEZDETI	9,24 x 10 ⁶	6,25	93,75	1,04 x 10 ⁷	6,25	93,75
	VÉGSŐ	1,97 x 10 ⁷	31,2	68,8	5,96 x 10 ⁷	68,1	31,9
1:17	KEZDETI	9,13 x 10 ⁶	5,55	94,45	1,03 x 10 ⁷	5,55	94,45
	VÉGSŐ	1,90 x 10 ⁷	24,9	75,1	5,69 x 10 ⁷	65,8	34,2
1:20	KEZDETI	9,01 x 10 ⁶	4,76	95,24	1,02 x 10 ⁷	4,76	95,24
	VÉGSŐ	1,99 x 10 ⁷	18,5	81,5	5,35 x 10 ⁷	71,4	28,6

III.b táblázat Kevert kultúras erjesztés megnövelt vadélesztő aránnyal. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok (*S. cerevisiae-S. delbrueckii*, *S. cerevisiae-T. delbrueckii*)

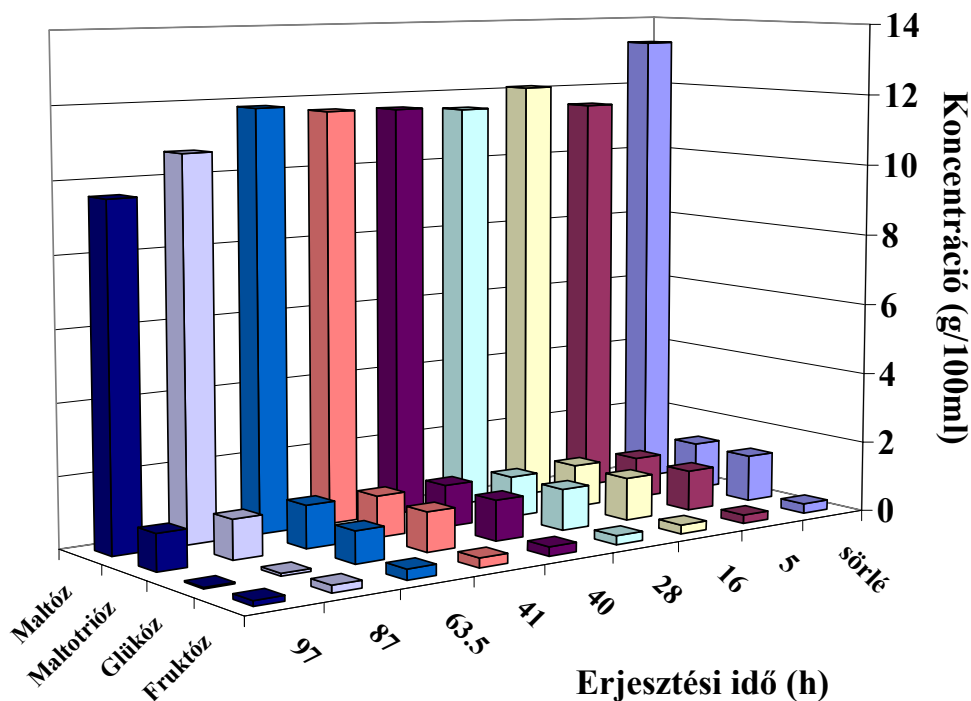
		<i>S. cerevisiae – S. delbrueckii</i>			<i>S. cerevisiae – T. delbrueckii</i>		
		SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %	SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %
1:12	KEZDETI	1,09 x 10 ⁷	7,6	92,4	1,06 x 10 ⁷	7,6	92,4
	VÉGSŐ	1,10 E+08	29,2	70,8	9,50 x 10 ⁷	55,8	44,2
1:15	KEZDETI	1,07 x 10 ⁷	6,25	93,75	1,04 x 10 ⁷	6,25	93,75
	VÉGSŐ	1,12 x 10 ⁸	32,1	67,9	7,35 x 10 ⁷	51,4	48,6
1:17	KEZDETI	1,06 x 10 ⁷	5,55	94,45	1,03 x 10 ⁷	5,55	94,45
	VÉGSŐ	1,62 x 10 ⁸	23,8	76,2	1,05 x 10 ⁸	50	50
1:20	KEZDETI	1,05 x 10 ⁷	4,76	95,24	1,02 x 10 ⁷	4,76	95,24
	VÉGSŐ	1,45 x 10 ⁸	19	81	8,85 x 10 ⁷	42,9	57,1

IV. táblázat Kevert kultúras erjesztés *Saccharomyces cerevisiae* WS 34/70 sörélesztővel és *Saccharomyces ludwigii* élesztővel. Kezdeti és végső sejtkoncentrációk és sörélesztő-idegen élesztő arányok

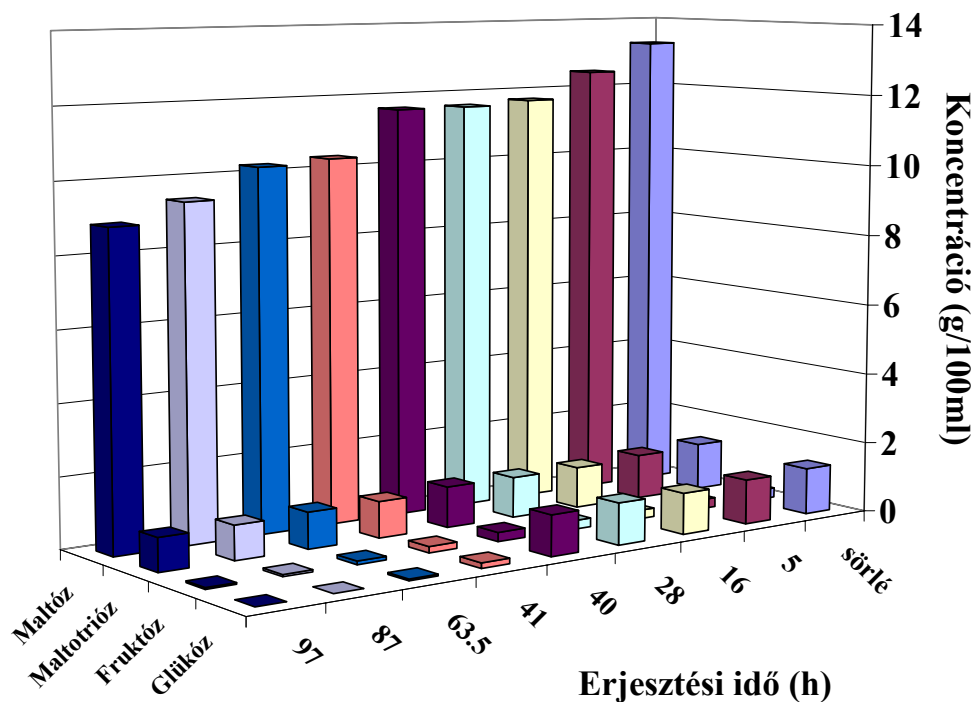
		SEJT KONCENTRÁCIÓ (SEJT/ML)	SÖRÉLESZTŐ %	IDEGEN ÉLESZTŐ %
1:12	KEZDETI	1,03 x 10 ⁷	7,6	92,4
	VÉGSŐ	1,45 x 10 ⁷	22,41	77,59
1:12	KEZDETI	1,03 x 10 ⁷	7,6	92,4
	VÉGSŐ	1,45 x 10 ⁷	18,28	81,72
1:12	KEZDETI	1,03 x 10 ⁷	7,6	92,4
	VÉGSŐ	1,43 x 10 ⁷	19,93	80,07
1:15	KEZDETI	1,01 x 10 ⁷	6,25	93,75
	VÉGSŐ	1,27 x 10 ⁷	15,41	84,59
1:15	KEZDETI	1,01 x 10 ⁷	6,25	93,75
	VÉGSŐ	1,21 x 10 ⁷	14,88	85,12
1:15	KEZDETI	1,01 x 10 ⁷	6,25	93,75
	VÉGSŐ	1,33 x 10 ⁷	11,32	88,68
1:17	KEZDETI	1,01 x 10 ⁷	5,55	94,45
	VÉGSŐ	1,21 x 10 ⁷	16,94	83,06
1:17	KEZDETI	1,01 x 10 ⁷	5,55	94,45
	VÉGSŐ	1,41 x 10 ⁷	14,18	85,82
1:17	KEZDETI	1,01 x 10 ⁷	5,55	94,45
	VÉGSŐ	1,58 x 10 ⁷	16,14	83,86
1:20	KEZDETI	6,98 x 10 ⁶	4,76	95,24
	VÉGSŐ	1,37 x 10 ⁷	16,42	83,58
1:20	KEZDETI	6,98 x 10 ⁶	4,76	95,24
	VÉGSŐ	1,22 x 10 ⁷	25,51	74,49
1:20	KEZDETI	6,98 x 10 ⁶	4,76	95,24
	VÉGSŐ	1,43 x 10 ⁷	14,74	85,26



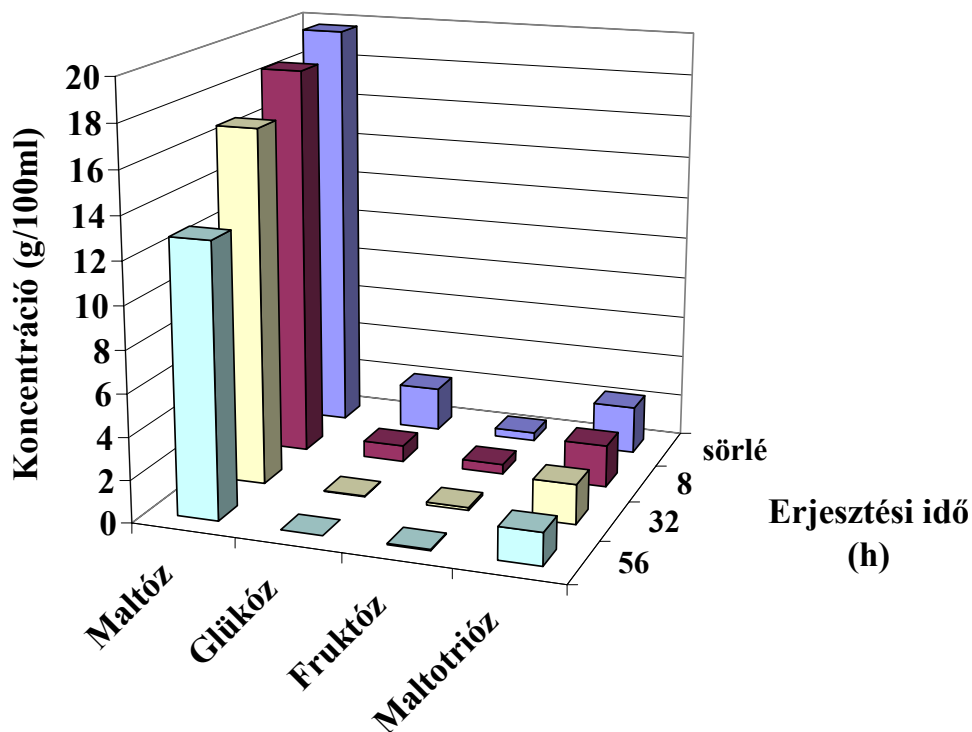
I. ábra. Szénhidrát felhasználás az „A” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:10 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 8°C.



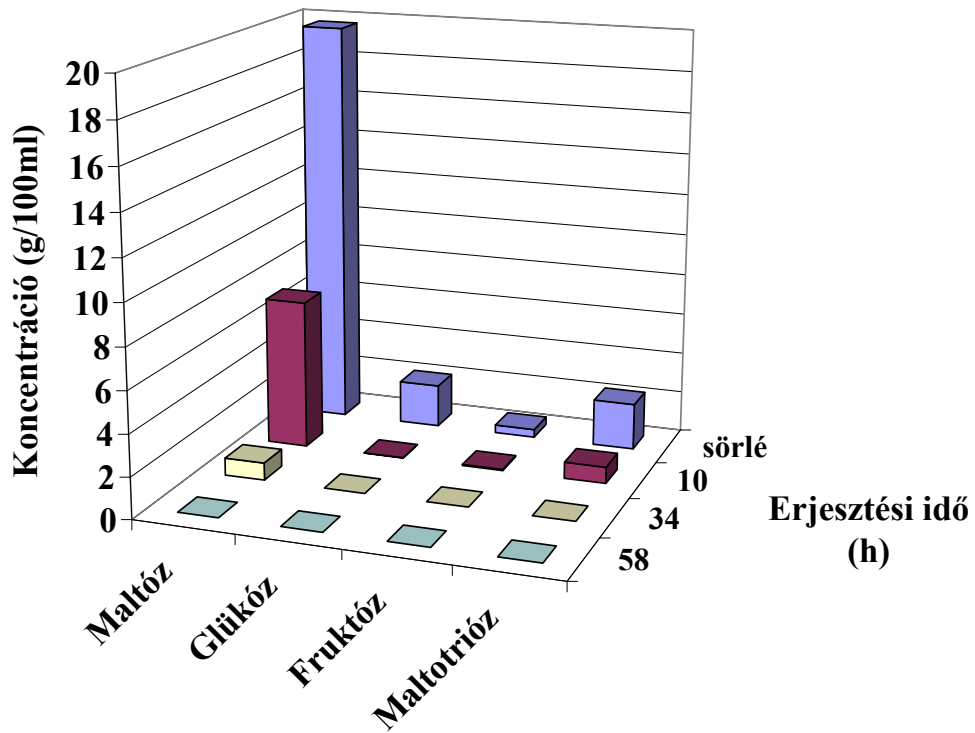
II. ábra. Szénhidrát felhasználás az „A” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat elő- és főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:15 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 8°C.



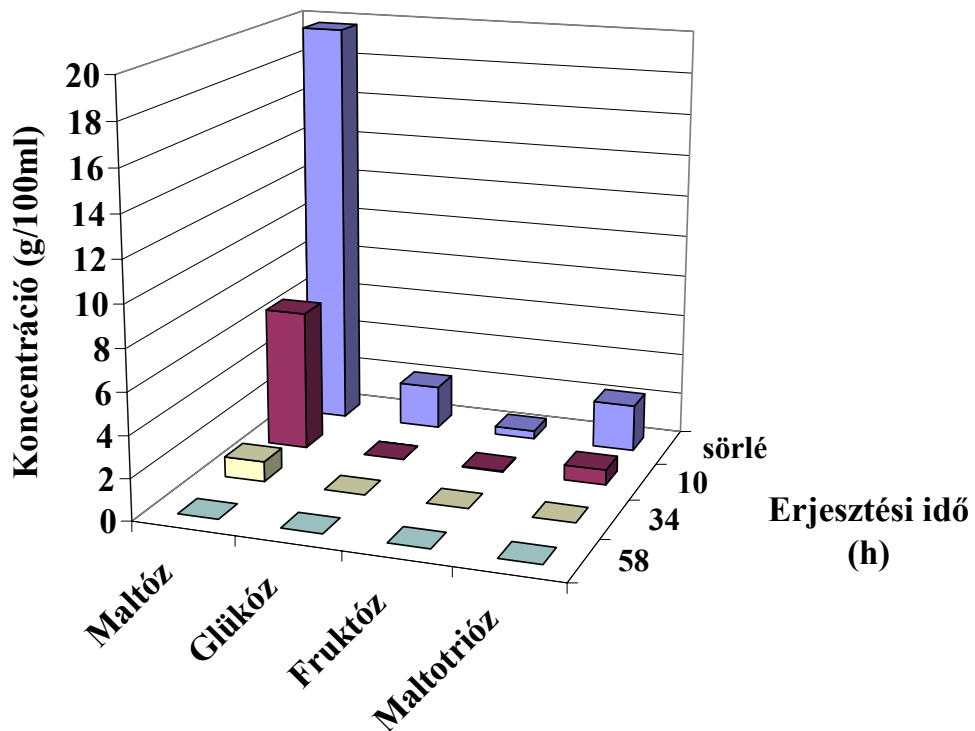
III. ábra. Szénhidrát felhasználás az „B” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat elő- és főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:10 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S. codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 8°C.



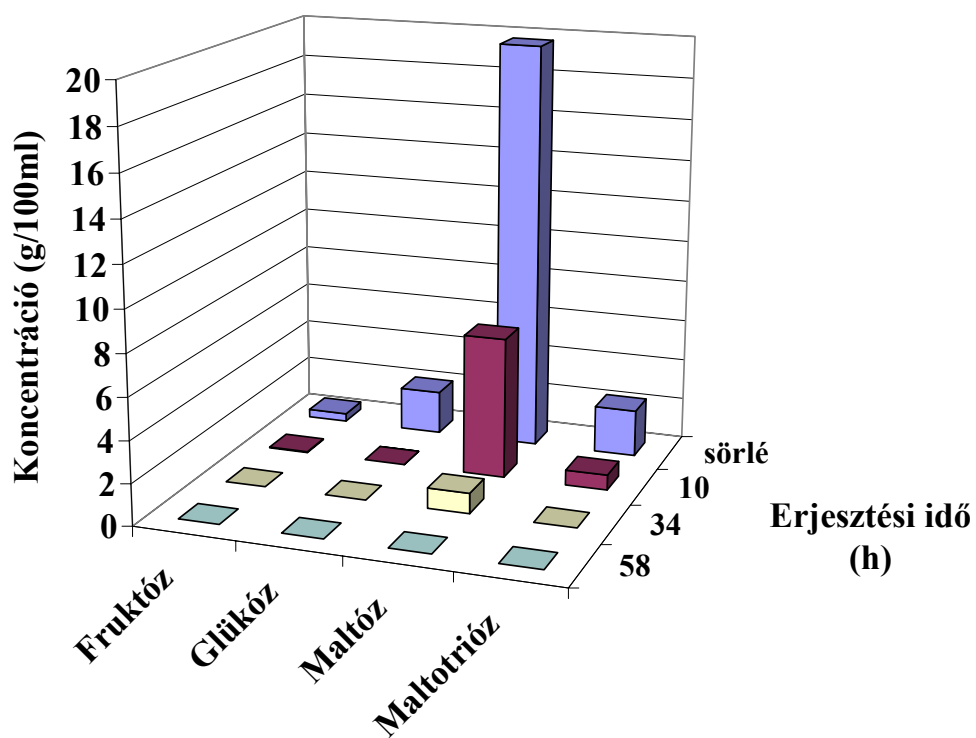
IV. ábra. Szénhidrát felhasználás az „B” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:20 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S. codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 8°C.



V. ábra. Szénhidrát felhasználás az „A” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:10 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 20°C.



VI. ábra. Szénhidrát felhasználás az „A” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:30 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S'codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 20°C.



VII. ábra. Szénhidrát felhasználás az „B” módszerrel végzett kölcsönhatás vizsgálat főfermentációja során. Kezdő sejtarány 1:30 (*S. cerevisiae* WS 34/70 és *S. codes ludwigii*), erjesztési hőmérséklet 20°C.