Szent István Egyetem
Kertészettudományi Kar
Szőlészeti és Borászati Intézet
Borászati Tanszék

BORÉLESZTŐK METABOLIKUS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA STRESSZKÖRÜLMÉNYEK KÖZÖT, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A CUKORTARTALOMRA

Oláhné Horváth Borbála

Doktori értekezés tézisei

Témavezető:
Dr. Magyar Ildikó

Budapest

2020

A doktori iskola

megnevezése:	Kertészettudományi Doktori Iskola
tudományága:	Növénytermesztési és kertészeti tudományok
vezetője:	Zámboriné dr. Németh Éva egyetemi tanár, DSc Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Gyógy és Aromanövények Tanszék
Témavezető:	Dr. Habil. Magyar Ildikó nyugalmazott egyetemi docens, PhD Szent István Egyetem, Kertészettudományi Kar, Borászati Tanszék

A jelölt a Szent István Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.

.....	.....
Az iskolavezető jóváhagyása	A témavezető jóváhagyása

1. A munka előzményei

A borászatban a kereskedelmi élesztő starter kultúra használat az elmúlt hatvan évben terjedt el, azonban a mai napig nem kizárólagos a használata. Az első starter kultúrák megjelenését követően egy dinamikusan fejlődő, egyre szerteágazóbb iparággá nőtte ki magát, ami folyamatosan még kiemelkedőbb tulajdonságú törzsek új termékként való piacra juttatásán dolgozik, így szolgálva a borászok munkáját és közvetve a fogyasztói ízlést. Több évtizedes kutató-fejlesztő munka eredményeként jelenleg több száz borélesztő starter kapható a piacon, a paletta azonban évről évre bővül.

A nem-*Saccharomyces* élesztők megítélése az elmúlt időben jelentősen átalakult a semleges és/vagy negatív pozícióból, egyes fajok szelektált törzsei borerjesztésre kimondottan alkalmasnak bizonyultak. A *Saccharomyces cerevisiae* (és kisebb mértékben a *Saccharomyces bayanus var. uvarum*) korábbi monopol helyzete számottevően diverzifikálódott. Ugyanakkor kutatási oldalról ezen szelekciós munka és az azt követő aktív szárított élesztő gyártás kidolgozása még messze nem zárult le. Például a *Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina)* néhány borászati szempontból értékes tulajdonsággal ígéretes starter jelölt.

A nem-*Saccharomyces*ek alkalmazása az esetek túlnyomó többségében keverék kultúrás, kombinált erjesztéssel valósulhat meg, ami a korábbi monokultúrás erjesztés dinamikáját, metabolitjait, irányítását és egyéb aspektusait felülírja, sokrétűvé teszi.

Az élesztő szelekció része a kijelölt törzsek tulajdonságainak screenelése, előbb általános mikrobiológiai, majd valós borászati körülmények közt. Első lépésként szükséges ismereteket szerezni a faj egészéről és a fajon belüli diverzitás mértékéről, ami a *S. cerevisiae* esetén nagyon sok tulajdonságra már jól ismert. Lényegesen kevesebb az információnk a *S. bayanus var. uvarum*-ról és csak az utóbbi évtizedben került a kutatások homlokterébe a *S. bacillaris* faj.

A starter jelöltek, illetve a már kapható készítmények stressz tűrésének határait definiálva hasznos információt nyerhetünk arról, hogy az átlagos borerjesztési körülményektől eltérve, milyen teljesítményre számíthatunk. Ilyen helyzet lehet például egy természetes édes, vagy botrítizálódott bor készítése (pl. Tokaji Aszú), ahol extrém ozmotikus viszonyokat kell az erjesztő törzseknek tolerálni. A szőlő cukortartalma a nem édes borok készítésénél is egyre növekszik számos okból (pl. klíma változás), tehát az ozmotikus stressz tűrésének kiemelt szerepe van. Az egyre alacsonyabbra tolódó erjesztési hőmérsékleti trend miatt a törzsek hidegtűrése is ide sorolható.

A fent említett kérdéskörhöz kapcsolódva doktori kutatómunkám során *S. bacillaris* esetén különböző stressz hatások sejtszaporodásra és metabolikus aktivitásra gyakorolt hatását vizsgáltam, a két legfontosabb borélesztőhöz, *S. cerevisiae*-hez és *S. bayanus var. uvarum*-hoz hasonlítva.

A három faj összehasonlító vizsgálati megközelítését az indokolja, hogy egyrészt a Tokaji Aszú spontán erjedésében döntően ezek a fajok együttesen vesznek részt, másrészt keverék starter kultúraként együttes alkalmazásuk számításba jöhet.

2. A kitűzött célok

A munka középpontjában a *S. bacillaris* áll, értékes tulajdonságainak összevetése *Saccharomyces* élesztőkkel, már leírt ellenállóképességének tovább pontosítása speciális borerjesztési helyzetekben, valamint még nem ismert toleranciájának definiálása. Ugyanakkor törekedtem felfedni használatának limitációit is. Ezek alapján célkitűzésem volt:

- A borászati viszonylatban még reális emelkedő kiindulási cukortartalom, a csökkenő erjedési hőmérséklet, illetve ezen stresszhatások kombinált hatását vizsgálni a fent említett három faj néhány szelektált törzsének összehasonlításával. A *S. bacillaris*-t korábban ozmotoleráns és hidegtűrő fajként írták le általános mikrobiológiai karakterizálása során, ezt kívántam igazolni borászati körülmények között.

- A *S. cerevisiae, S. bayanus var. uvarum* (továbbiakban: *S. uvarum), S. bacillaris* és *Zygosaccharomyces bailii* (mint rendkívül toleráns, romlást okozó borélesztő) szaporodási képességeit nyomon követni, nem endogén eredetű, emelkedő közepes szánláncú zsírsavak (MCFA) okozta stressz esetén.

- *S. bacillaris, S. cerevisiae* és *S. uvarum* egyes szelektált törzsei esetén célom vizsgálni az emelkedő kiindulási cukortartalom (magas és extrém magas tartomány) hatását az erjedés fő metabolitjaira, nem illékony másodlagos anyagcseretermékekre és a nitrogén hasznosítás egyes aspektusaira.

- A kiindulási cukortartalom okozta stressz hatása kapcsán összehasonlítottam a három faj sejten belüli glicerin felhalmozás és a sejten kívüli glicerin kibocsájtás alakulását, azaz a glicerin képzés szerepét az ozmotikus stressz kivédésében.

- Végül célom, *S. bacillaris* esetén – előkísérlet szintjén - félüzemi léptékű kombinált beoltási módok összevetése, ahol az analitikai paraméterek mellett a kierjedt újborok érzékszervi értékelésre is sor kerülhet.

Dolgozatomnak nem célja a kiválasztott stressz hatások molekuláris, genetikai hátterének vizsgálata, hanem a fenotípusos jellemzőkben és aktivitásokban bekövetkező változásokat tanulmányozom, valamint ahol alkalmazható, matematikai-statisztikai módszerekkel értékelem.

3. Anyag és módszer

A vizsgálatok során alkalmazott élesztő törzsek kereskedelmi starterek, típus törzsek és a Borászati Tanszék törzsgyűjteményi törzsei (korábbi azonosításuk klasszikus és/vagy molekuláris analízissel történt), melyek túlnyomó többsége eredetileg borászati anyagokról, mustokból, borokból származik. Az egyes kísérletek során eltérő törzskészlettel dolgoztam, azonban a *S. bacillaris*-t minden vizsgálat során *S. cerevisiae*-hez és *S. uvarum*-hoz hasonlítottam, illetve egy esetben *Zygosaccharomyces bailii*-hez is.

A szaporodási és erjedési kísérletek tápközegei a félüzemi erjesztés kivételével sterilizált természetes mustok (Bianca I-III. és Szürkebarát) és természetes mustokat imitáló modell közegek (erjedésben elakadt modell must, Santos *et al*., 2008 alapján; modell leves és agar MCFA törzsoldattal kiegészítve; módosított YEPD agar; modell must erjedési metabolitok vizsgálatához Henschke és Jiranek, 2003 alapján) voltak. A vizsgálatok során a kiindulási cukor tartalom fokozatai egy teljes érésben levő szőlő mustját (220-250 g/L), számottevő túlérésben levő szőlő mustját (270-320 g/L), valamint erősen botrítizálódott szőlőt (370-470 g/L) reprezentálják. A választott erjedési hőmérsékletek közül 20 °C reprezentálta az általános erjesztési hőmérsékletet, 12 °C a reális hideg erjesztést, 6 °C pedig olyan rendkívül alacsony hőmérsékletet, ahol a *S. uvarum* irodalomból ismert, illetve a *S. bacillaris* feltételezett kriotoleranciája egyértelműen megnyilvánulhat.

A különböző léptékű (15-60-180-200 mL és 60 L) kísérleti erjesztésekhez (előkísérletek, hideg stressz, ozmotikus stressz, intracelluláris glicerin meghatározás, metabolikus profil vizsgálat, kevert tenyészetű félüzemi erjesztés) és szilárd táptalajon való növekedés vizsgálatokhoz (ozmotikus × hideg stressz; MCFA stressz) való inokulum készítés azonos volt.

Az alkalmazott hagyományos analitikai és mikrobiológiai módszerek (oldott szárazanyag-, alkohol-, illósav-, redukáló cukor-, titrálható sav tartalom, pH

érték, élő-holt sejtarány), enzimatikus-spektrofotometriás vizsgálatok (L-almasav-, glicerin-, asszimilálható nitrogén tartalom, L-borostyánkősav-, oldottfehérje tartalom és fehérje mentesítés, glükóz-fruktóz arány, optikai denzitás) és érzékszervi bírálat (profil analízis) az OIV ide vonatkozó leírásai, a különböző kitek esetén a gyártó ajánlásai szerint történtek. A H^1 NMR vizsgálat Godelmann *et al.* 2012 szerint történt Bruker AVANCE 400 spektrométerrel és 400'54 ASCEND magnet rendszerrel.

A Drop-teszt (Perez-Torrado *et al.*, 2016 alapján) kivitelezése: eltérő összetételű, összetett, szilárd agar felületen történtő tenyésztés Petri csészében. 10-es alapú sorozat hígítás 6 vagy 4 tagjának kivitele 10/5 µL mennyiségben az agar lemez felületére, majd megfelelő idejű inkubációt követően a kolóniák felvételezése, állandó megvilágítású látómezőben. A vizsgálat ideje alatt ismételt képfelvételezés, Sony Exmor RS IMX315 12 MP kamerával, majd képfeldolgozás, növekedés számszerűsítése ImageJ szoftver (Schneider *et al.*, 2012) terület elemző funkciójának segítségével.

Intracelluláris glicerin nyomon követése Perez-Torrado *et al.* (2016) módosított módszere alapján.

A kísérletek során alkalmazott újabb *S. bacillaris* izolátumok faj szintű azonosítását 26 S rDNS D1-D2 domain segítségével végeztem.

Az eredményeket különböző egy és több változós statisztikai módszerekkel értékeltem, feltétel vizsgálatot követően: egy és több szempontos varianciaanalízis, egy változóval (ANOVA), egy és több szempontos, több változós varianciaanalízis (MANOVA), kereszttáblaelemzés (CROSSTAB), fő komponens analízis (PCA) segített a mérési adatok értelmezésében. Mindezt az IBM Corp. 2016 SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY (USA); Microsoft Corp. 2018 Office 365 Excel for Windows, Redmond, WA (USA) és az Addinsoft Inc. XLSTAT, MS Excel Add-in, Version 2020.1.2., New York, NY (USA) szoftverek segítségével tettem.

4. Az eredmények

4.1. Az előkísérlek során nyomon követett erjedés lefutások segítségével csökkentettem főként a metabolikus profil vizsgálat *Saccharomyces* törzskészletét. Mivel nem optimalizálás volt a cél, az eredeti variabilitás megőrzése mellett robosztus és moderált törzsek is kiválasztásra kerültek. A válogatást 250 g/L kezdeti cukortartalmú must erjesztése, valamint egy erjedésben elakadt mustot modellező közeg újraerjesztése alapján végeztem.

4.2. A *S. bacillaris* szaporodási képességét a **csökkenő erjedési hőmérséklet** jelentősen befolyásolta. 20°C-on megnyilvánul a faj mérsékelt sejtszaporodási és erjesztési erélye a vizsgált *Saccharomyces*-ekhez képest. Míg a 12°C a *S. bacillaris* fajlagos szaporodási sebességét és erjesztési dinamikáját is jelentősen befolyásolta, így elmarad mindkét *Saccharomyces*-től, addig 6°C-on a sejtszaporodás rendkívül vontatott, az elerjesztett cukor mennyisége nagyon alacsony, hasonlóan a *S. cerevisiae*-hez. A *S. bacillaris* hidegtűrése a vizsgált hőmérséklet tartományban valós borerjesztési körülmények között a kriotoleráns *S. uvarum*-mal nem összevethető (**1. tézis**).

4.3. A *S. bacillaris* szaporodási képességét a **növekvő kiindulási cukortartalom** függvényében vizsgálva megállapítható, hogy az emelkedő cukortartalomnak a 220-320 g/L-es tartományban jelentős hatása van a vizsgált borélesztők szaporodás kinetikai mutatóira, azonban fajonként eltérő mértékben. A *S. bacillaris* fajlagos szaporodási sebessége jelentősen csökken a kiindulási cukortartalom emelkedésével, azonban a populáció nagyságát kevésbé érinti az ozmotikus viszonyok változása. A megfigyelési időszak végén a *S. bacillaris* törzsek által összesen kierjesztett 50-60 g/L cukor túlnyomó részt fruktóz volt, míg a vizsgált *Saccharomyces* törzsek összesen 140-150 g/L cukrot hasznosítottak erős glükóz preferenciával.

4.4. A *S. bacillaris* szaporodási képességét a **növekvő kiindulási cukortartalom és erjedési hőmérséklet, mint kombinált stressz faktorok** függvényében vizsgálva megállapítható, hogy a három faj növekedése 20°C-on, az alacsonyabb cukor tartományban összevethető, azonban a magasabb cukor koncentrációknál a két *Saccharomyces* élesztő növekedése visszaszorul, ellentétben a *S. bacillaris*-szal. A hőmérséklet csökkenésére a kriotoleráns *S. uvarum* alig reagál, míg a *S. cerevisiae* növekedése jelentősen mérséklődik. A *S. bacillaris* növekedése sokkal kevésbé szorul vissza, főként az extrém cukortartalom (470 g/L × 12 °C) mellett (**1. tézis**).

4.5. A közepes szénláncú telített zsírsavak gátló hatása a *S. bacillaris* esetén már 10 mg/L-es koncentrációban is megnyilvánult, a két vizsgált *Saccharomyces* élesztő szaporodása 20 és 40 mg/L MCFA esetén enyhén szorult vissza, jelentősebb fajon belüli variabilitással, míg a 80 mg/L mellett nem volt képes növekedni a fenti 3 faj. A *Z. bailii* komoly gazdasági károkért felelős romlást okozó élesztő még a legmagasabb gátlóanyag fokozatot is tolerálta. A vizsgált törzsek fajon belüli MCFA toleranciabeli különbségét nem magyarázza sem földrajzi eredetük, az izolálás közege vagy erjesztési robosztusságuk. (**2. tézis**).

4.6. A kombinált stresszor (4.4.) és MCFA gátlás (4.5.) vizsgálatok során Drop-tesztet alkalmaztam látómezős képelemzéssel összekötve. Ahol a különböző szintre beállított pl. cukor koncentrációkban adódó jelentős eltérés miatt a szaporodási adatok nyers számszerűsítése jelentős torzításhoz vezetett, így egy-egy felvételen belüli, az agar összetétellel együtt változó viszonyítási pontot kellett meghatározni, amit a sejt kultúra hígítatlan felvitelével képzett teljes csepp benövésű „kalibráló cellával” sikerült megtenni. Ezen kívül a hígítási sor tagjai által képzett 3 párhuzamos „mérő cella” felvitele történt 1-1 Petri-csészébe. Egy-egy törzs %-os formában megadott növekedése normálásra került, mind a kontroll növekedéssel (25 g/L cukor tartalom vagy 0 mg/L gátlóanyag)

mind az agar körülményekkel, így az összehasonlítás jelen esetben 6-20°C × 25-470 g/L cukor tartalom vagy 0-80 mg/L MCFA között torzítás mentesen, számszerűsítve megvalósíthatóvá vált, amire mint saját módszerfejlesztésre tekintek **(5. tézis**).

4.7. Az intracelluláris glicerin képzés vizsgálata során a *S. bacillaris* sejten beüli glicerin felhalmozása a kezdeti aránylag magas értékről az erjedés első 72 órájában nem változtak számottevően, míg a vizsgált *Saccharomyces*-ek esetén jelentős növekedés volt megfigyelhető. Mindezt a *S. bacillaris* esetén nem kompenzálta a sejten kívüli glicerin mennyisége sem, mivel az erjedés elején a három faj közt nem volt különbség, majd 72. órában szintén jelentősen elmarad a *S. bacillaris* a másik két fajhoz képest (**3. tézis**).

4.8. A metabolikus profil vizsgálat során az emelkedő cukor tartalom hatására változó erjedés fő metabolitjait, a nitrogén hasznosítás egyes aspektusait és nem illékony másodlagos anyagcseretermékeket, illetve azok kihozatalát vizsgáltam. Az egyes metabolitokat egyesével értékelve a kiindulási cukortartalomban való változás hatására eltérő reakciók voltak megfigyelhetők a három faj és törzseik esetén. Például az illósav termelés cukorfüggését tekintve a *S. uvarum* törzsek mutatták a legkisebb mértékű változást, a *S. bacillaris* illósav képzése számottevő fajon belüli variabilitást mutat, jelen esetben 2 törzs a kiindulási cukor függvényében több ecetsavat termelt, míg egy esetben ez nem igazolható. A *S. cerevisiae* törzsek jelentős ecetsav termelésbeli emelkedéssel válaszoltak a kiindulási cukor szint emelkedésére. Főkomponens analízis segítségével több változó együttes értékelésére került sor, a dimenzió csökkentett térben a *S. bacillaris* egyértelműen elkülöníthető vizsgált fermentatív aktivitása alapján a két *Saccharomyces* élesztőtől mindkét cukor fokozaton **(4. tézis**).

4.9. A félüzemi kombinált erjesztési kísérlet során szekvenciális és ko-inokulált beoltási módokat hasonlítottam egy *S. bacillaris*- *S. cerevisiae* pár esetén monokultúrás *S. cerevisiae* erjesztéshez. Az erjedés lefutásában minimális

eltérés volt megfigyelhető, míg a kierjedt borok alapanalízisében sem adódott jelentős különbség. Az érzékszervi bírálat során a két beoltási mód között nem adódott számottevő eltérés, alapvetően a kombinált nem-*Saccharomyces* használat lényeges előnyei sem illat, sem íz karakterben nem nyilvánultak meg. Ezen fenti eredmények az adott élesztő párosítás alkalmatlanságára utalnak, azonban az irodalomban több sikeres *S. bacillaris*-*S. cerevisiae* eredmény található, tehát általánosítani nem érdemes.

5. Új tudományos eredmények

1. tézis. A *S. bacillaris* kriotoleranciáját – normál borászati körülmények között – nem erősítettem meg. A cukor és hidegtűrés tekintetében a *S. bacillaris* esetén a két stressz tényező szaporodás gátló hatása nem additív, hanem a cukor koncentráció emelkedésével, az ozmotolerancia meghatározóbb, mint a korlátozott hidegtűrés. 12 °C-on a magasabb cukorkoncentráció egyfajta 'védőhatással' van a faj növekedésére, abban az értelemben, hogy a másik két fajhoz képest kevésbé szorul vissza.

2. tézis. A *S. bacillaris* szenzitív az erjesztés közegében jelen lévő közepes szénláncú zsírsavakra, míg a *S. cerevisiae* és *S. uvarum* mérsékelten toleráns. A *Z. bailii* visszaerjedésért gyakran felelős, romlást okozó élesztő kiemelkedő toleranciával bír.

3. tézis. Az erjedés végén mérhető magas extracelluláris glicerin kibocsátás mellett, az erjedés kezdeti intracelluláris glicerin termelési dinamika *S. bacillaris*-nál számottevően különböző a *Saccharomyces*-ekhez képest. A S. *bacillaris* lényegesen alacsonyabb intracelluláris glicerin felhalmozással válaszol az azonos mennyiségű kiindulási cukortartalomra, ami arra utal, hogy ennél a fajnál a glicerinnek kisebb jelentősége van az ozmotikus stressz elleni védekezésben.

4. tézis. *S. bacillaris* metabolit profil módosulása (pl. YAN hasznosítás csökkenés, prolin hasznosítás javulása, az illósav tartalom képzése törzsfüggő, bizonyos esetekben cukor-függő mértékű) extrém cukor koncentráción jelentősen eltérő a vizsgált *S. cerevisiae*-hez és *S. uvarum*-hoz képest.

5. tézis. A korábbi munkákban elérhető Drop-teszt (pl. Perez-Torrado *et al.*, 2016) és látómezős képelemzés (pl. Schneider *et al*., 2012) összekapcsolása és a cellaviszonyok értelmezésének kidolgozása módszerfejlesztésként értelmezhető. A jelentősen eltérő közegek összehasonlítása vált lehetővé, a cella viszonyok kidolgozásával, nem pusztán szemrevételezéssel, hanem standard módon, számszerűsítve.

6. Következtetések és a javaslatok

Az előkísérlet eredményeiből a törzsek kiválasztásán túl az alábbi megerősítő következtetéseket tudtam levonni a két *Saccharomyces* fajról korábban ismert borászati tulajdonságokra vonatkozóan. Normál cukortartalmú mustokban a borászati környezetből származó *S. uvarum* törzsek erjesztési intenzitása alig marad el a *S. cerevisiae* törzsekétől. Nagy cukortartalmú, tápanyagszegény közegben a *S. uvarum* törzsek lényegesen gyengébb erjesztőképességet mutatnak. A fruktóz hasznosítás képessége mindkét faj minden vizsgált törzsében szignifikáns, de egyik fajban sem találtam kiemelkedő törzseket. A *S. uvarum* kriotoleranciája világosan igazolódott.

A *S. bacillaris* szaporodási képességéről különböző környezeti stressz faktorok közt a következő megállapításokat teszem. A *S. bacillaris* hidegtűrése az irodalomból is ismerten kriotoleráns *S. uvarum*-hoz képest elmarad, képes szaporodni alacsony hőmérsékleten, azonban annak sebessége bor erjesztési körülmények között nem elfogadható. A maximális fajlagos szaporodási sebességet az alacsony erjesztési hőmérséklet jobban befolyásolta, mint a maximális sejtszámot. Az ismerten lassú szaporodású nem-*Saccharomyces* élesztő kombinált alkalmazásakor, a megfelelően magas erjedési hőmérséklet megválasztását szem előtt kell tartani. Kevert tenyészetben, hidegerjesztésnél nem javasolt, sőt a hőmérséklettel pl. lehűtéssel lehet szabályozni a részvételét/visszaszorítását. A *S. bacillaris* kiemelkedő ozmotoleranciája széles tartományban megerősítést nyert (220-470 g/L cukor), valamint a cukortűrést hideg stresszel kombináltan vizsgálva, 12 °C-on az extrém cukor fokozaton a kriotoleráns *S. uvarum*-nál is jobb növekedést figyeltem meg. A *S. bacillaris* esetén a két stressz tényező szaporodás gátló hatása nem additív, hanem a cukor koncentráció emelkedésével, a kiemelkedő ozmotolerancia meghatározóbb, mint a korlátozott hidegtűrés. Ezen eredmény részben magyarázza, hogy miért izolálható nagy gyakorisággal például Tokaji borkülönlegességekből ez a faj,

ahol a cukor koncentráció esetenként extrém magas, az erjedési hőmérséklet pedig alacsony (~13 °C).

A közepes szénláncú telített zsírsavak gátló hatásától kevés volt az irodalmi adat. Eredményeim alapján a zsírsavak jelentős szaporodás gátló hatással vannak *S. bacillaris*-ra, azonban az inhibíció a *S. cerevisiae* és *S. uvarum* esetén is jelentős, míg a *Z. bailii* toleranciája a legerősebb a vizsgált fajok közül. A *S. bacillaris* egyéb előnyös tulajdonságai (mint határozott fruktofilia, alacsony etanol képzés, azonban jó etanol tolerancia) alapján egy erjedésben elakadt tétel újraindítására alkalmas fajnak tűnt, azonban mérsékelt közepes szénláncú zsírsav toleranciája miatt megkérdőjeleződik erre való alkalmassága. Másrészt a közepes szénláncú zsírsavak jövőbeni üzemi alkalmazása során a *Z. bailii* faj magas toleranciája komoly limitációja lehet az erjedés gátlásnak, továbbá a minimális hatékony koncentráció meghatározásakor feltétlenül figyelembe kell venni.

Az intracelluláris glicerin képzési dinamikát nyomonkövető vizsgálatból a következők állapíthatók meg. A *S. bacillaris* sejten belüli glicerin képzése a *Saccharomyces* élesztőktől eltérő dinamikával történik, azoktól mennyiségileg jelentősen elmarad. Ebből az feltételezhető, hogy a kiemelkedően ozmotoleráns fajnak azonos mennyiségű kiindulási cukortartalom kisebb stressz hatást jelent, valamint feltételezhető, hogy a *S. bacillaris* cukortűrésében a glicerin nem azonos szerepet játszik, mint a *Saccharomyces*-ek esetén, esetleg más védekezési mechanizmus aktiválódása is felmerülhet.

A metabolikus profil vizsgálat eredményeit az emelkedő kiindulási cukortartalom mellett összegezve az alábbi következtetéseket vontam le. A 320 g/L kiindulási cukortartalom erjesztése során cukor fogyasztás görbéje hasonló lefutású a 220 g/L cukortartaloméhoz a vizsgált *S. bacillaris* és *S. uvarum* törzsek esetén, számottevő maradék cukortartalommal. A *S. bacillaris* illósav képzése számottevő fajon belüli variabilitást mutatott, amit az irodalomban található eltérő adatok tovább erősítenek. Csökkentett illósav termelés céljára a *S.*

bacillaris vizsgált törzsei nem alkalmasak. A *S. bacillaris* erős fruktofiliája, mérsékelt etanol és kiemelkedő glicerin termelése és pozitív cukor-függő mivolta jelen dolgozatban is megerősítést nyert. A *S. bacillaris* visszafogott nettó szerves savtermelése miatt mérsékelten alkalmas savszegény évjáratokban harmóniajavításra. A vizsgált *S. bacillaris* törzsek azonnal felvehető nitrogén hasznosítása az extrém cukor koncentráción mérsékeltnek adódott, továbbá 320 g/L cukortartalom esetén, kis mértékű prolin hasznosítás is megfigyelhető volt. Mindezek a tulajdonságok kimondottan előnyösek lehetnek kevert kultúrás erjesztés esetén magas vagy extrém kiindulási cukortartalmú közegekben. A metabolit profil egészét tekintve, a *S. bacillaris* egyes reakciói a magasabb cukor jelentette stresszre jelentősen eltérőnek adódtak a vizsgált *Saccharomyces*-ekhez képest.

A félüzemi kombinált erjesztési kísérlet alapján arra lehet következtetni, hogy a ko-inokulált vagy szekvenciálisan alkalmazott *Saccharomyces* és nem-*Saccharomyces,* jelen esetben *S. bacillaris,* törzsek kompatibilitása a sikeres kevert kultúrás erjesztés egyik záloga. Félüzemi léptékben tesztelve alkohol csökkentésre és savharmónia javításra nem kimondottan alkalmas a Y1756 *S. bacillaris* és az UVAFERM®228 *S. cerevisiae* törzspárosítás kombinált erjesztéssel, beoltási módtól függetlenül. A vizsgált törzsek (Y1756 *S. bacillaris* és Uvaferm®228 *S. cerevisiae*) együttes alkalmazása nem ajánlható, az erjedés során tapasztalt minimális eltérés, valamit a kierjedt borban a beoltási módok elhanyagolható analitikai és érzékszervi érvényesülése miatt, konvencionális *S. cerevisiae*-vel (Uvaferm®228) véghez vitt erjesztéshez képest. Ugyanakkor a beoltott fajok más törzs kombinációjáról ezen eredményből nem szabad általánosítani.

Összegezve a *S. bacillaris* egy ígéretes starter jelölt számos előnyös tulajdonsággal, ugyanakkor limitációit sem szabad figyelmen kívül hagyni. A közeljövőben ezen nem-*Saccharomyces* faj szelektált törzseinek jelentősége

lehet kevert tenyészetű erjesztések során, mivel számos borászati szempontból értékes tulajdonságát igazolták korábbi vizsgálatok és jelen doktori munka is. Továbbá a megfigyelt eltérő stressz válaszok kompenzálhatják a borerjesztés során adódó számos problémát. Eredményeim alapján a faj alkalmas résztvevője lehet olyan keverék kultúráknak (alapos kompatibilitási vizsgálatokat követően), amik kifejezetten extrém magas cukortartalom, vagy botrítizált alapanyag erjesztésére valók.

7. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk

Impact factoros folyóirat cikk

Borbála Oláhné Horváth, Diána Nyitrainé Sárdy, Nikolett Kellner, Ildikó Magyar: Effects of the high sugar content on the fermentation dynamics and some metabolites of wine-related yeast species *Saccharomyces cerevisiae, S. uvarum* and *Starmerella bacillaris*. Food Technology and Biotechnology, 58(1):76-83. https://doi.org/10.17113/ftb.58.01.20.6461 IF: 1,52 (2018); Q2.

Oláhné Horváth Borbála, Fazekas Eszter, Kellner Nikolett, Magyar Ildikó: Influence of Medium Chain Fatty Acids on Some Botrytized Wine-related Yeast Species and on spontaneous refermentation of Tokaj Essence. Acta Alimentaria. 49(3):339-347.
IF:0,547 (2018); Q3.

Nem impact factoros folyóirat cikk

Oláhné Horváth Borbála, Kellner Nikolett, Csuka Bence, Magyar Ildikó: Újabb *Saccharomyces* és nem-*Saccharomyces* starterkultúrák értékelése fehérborok erjesztésében. Borászati Füzetek, 30(2): 32-35.

Hazai konferencia összefoglaló

Ildikó Magyar, Miklós Kállay, **Borbála Oláhné Horváth**, Annamária Sólyom-Leskó, Nikolett Kellner, Diána Nyitrainé Sárdy: Phenotypic Characterization of *Starmerella Bacillaris (syn. Candida Zemplinina)* from Oenological Aspects; Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és 13. Fermentációs Kollokvium Eger, Absztraktfüzet. pp. 38.

Ildikó Magyar, **Borbála Oláhné Horváth**: Újabb *Saccharomyces* és nem-*Saccharomyces* élesztő starterkultúrák értékelése. I. Borászati Szakmai

Tudományos Konferencia, 2018, Kivonat-kötet. pp.12-13. (ISBN 978-615-00-2176-8).

Nemzetközi konferencia összefoglaló

Borbála Oláhné Horváth, Fanni Lajszner, Anna Pápai, Ildikó Magyar: Combined, osmotic and temperature stress tolerance of wine-related strains of *Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina)*. 3. International Food Conference, Budapest.
ISBN 978-963-269-794-9.

Borbála Oláhné Horváth, Vivien Kormos, Edina Nagy, Ildikó Magyar: Influence of the Osmotic Stress in Grape Must on the Growth Kinetics of Wine Related Strains of *Starmerella bacillaris (syn. Candida zemplinina)* 5 th Central European Forum For Microbiology – 2017. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 64(Suppl 1.): 156.

Borbála Oláhné Horváth, Nyitrai-Sárdy, Diána, Kellner, Nikolett, Magyar Ildikó: Change in metabolic footprint of some wine-related yeasts induced by extreme initial sugar content, 18th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2019 július 3-5. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 66(Suppl. 1.) 39.

Borbála Oláhné Horváth, Zita Balogh, Rebeka Takács, Ildikó Magyar, Andrea Pomázi: Influence of non-*Saccharomyces* Yeast Cultures on the Yeast and Lactic Acid Bacteria Population During Prefermentative Cold Maceration of Red Grapes 18th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, 2019 július 3-5. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 66(Suppl. 1.) 173.